

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Patent Application of

MENOZZI et al

Serial No. 09/192,579

Filed: November 17, 1998



Atty. Ref.: 960-34

Group:

Examiner:

For: IDENTIFICATION AND CLONING OF A  
MYCOBACTERIAL ANTIGEN CORRESPONDING TO A  
HEPARIN-BINDING HAEMAGGLUTININ

\* \* \* \* \*

February 8, 1999

Assistant Commissioner for Patents  
Washington, DC 20231

**SUBMISSION OF PRIORITY DOCUMENT**

Sir:

It is respectfully requested that this application be given the benefit of the foreign filing date under the provisions of 35 U.S.C. §119 of the following, a certified copy of which is submitted herewith:

<u>Application No.</u>	<u>Country of Origin</u>	<u>Filed</u>
96/06168	France	17 May 1996

Respectfully submitted,

**NIXON & VANDERHYE P.C.**

By: Mary J. Wilson

Mary J. Wilson

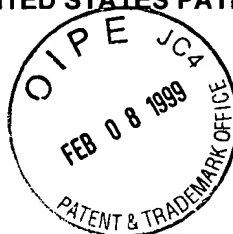
Reg. No. 32,955

MJW:tat  
1100 North Glebe Road, 8th Floor  
Arlington, VA 22201-4714  
Telephone: (703) 816-4000  
Facsimile: (703) 816-4100

**THIS PAGE BLANK (USP 10)**

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

032076



In re Patent Application of

**MENOZZI et al**

Serial No. **09/192,579**

Filed: **November 17, 1998**

Title: **IDENTIFICATION AND CLONING OF A MYCOBACTERIAL ANTIGEN CORRESPONDING TO A HEPARIN-BINDING HAEMAGGLUTININ**

Atty Dkt. **960-34**

C#/M#

Group Art Unit:

Examiner:

Date: **February 8, 1999**

Honorable Commissioner of Patents  
and Trademarks  
Washington, DC 20231

Sir:

**SUBMISSION OF PRIORITY DOCUMENT**

This is a response/amendment/letter in the above-identified application and includes an attachment which is hereby incorporated by reference and the signature below serves as the signature to the attachment in the absence of any other signature thereon.

**Fees are attached as calculated below:**

Total effective claims after amendment	0	minus highest number		
previously paid for	(at least 20) =	0	x \$ 18.00	\$ 0.00

Independent claims after amendment	0	minus highest number		
previously paid for	0 (at least 3) =	0	x \$ 78.00	\$ 0.00

If proper multiple dependent claims now added for first time, add \$260.00 (ignore improper)	\$ 0.00
--	---------

Petition is hereby made to extend the current due date so as to cover the filing date of this paper and attachment(s) (\$ 110.00 /1 month; \$380.00/2 months; \$870.00/3 months)	\$ 0.00
--	---------

Terminal disclaimer enclosed, add \$ 110.00	\$ 0.00
<input type="checkbox"/> Please enter the previously unentered	filed

First submission after Final Rejection pursuant to 37 CFR 1.129(a) (\$760.00)	\$ 0.00
---	---------

Second submission after Final Rejection pursuant to 37 CFR 1.129(a) (\$ 760.00 )	\$ 0.00
--	---------

<b>SUBTOTAL</b>	<b>\$ 0.00</b>
-----------------	----------------

If "small entity," then enter half (1/2) of subtotal and subtract	-\$ 0.00
<input type="checkbox"/> Statement filed herewith	

Rule 56 Information Disclosure Statement Filing Fee (\$ 240.00)	\$ 0.00
---	---------

Assignment Recording Fee ( \$40.00 )	\$ 0.00
--------------------------------------	---------

<b>TOTAL FEE ENCLOSED</b>	<b>\$ 0.00</b>
---------------------------	----------------

The Commissioner is hereby authorized to charge any deficiency in the fee(s) filed, or asserted to be filed, or which should have been filed herewith (or with any paper hereafter filed in this application by this firm) to our **Account No. 14-1140**. A duplicate copy of this sheet is attached.

1100 North Glebe Road  
8<sup>th</sup> Floor  
Arlington, Virginia 22201-4714  
Telephone: (703) 816-4000  
Facsimile: (703) 816-4100  
MJW:tat

**NIXON & VANDERHYE P.C.**

By Atty: Mary J. Wilson, Reg. No. 32,955

Signature: \_\_\_\_\_

*Mary J. Wilson*

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



GUTHMAN PLASSERAND S.A.

# BREVET D'INVENTION

**CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION**

## COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le **16 DEC. 1998**

Pour le Directeur général de l'Institut  
national de la propriété industrielle  
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE

**SIEGE**

26 bis, rue de Saint Petersburg  
75800 PARIS Cédex 08  
Téléphone : 01 53 04 53 04  
Télécopie : 01 42 93 59 30

THIS PAGE BLANK (uspto)

**REQUÊTE EN DÉLIVRANCE**

26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08  
Téléphone : (1) 42.94.52.52 Télécopie : (1) 42.93.59.30

Confirmation d'un dépôt par télécopie ☐

Cet imprimé est à remplir à l'encre noire en lettres capitales

<p style="text-align: right; font-size: small;">Réserve à l'INPI</p> <p>DATE DE REMISE DES PIÈCES <b>17.05.96</b></p> <p>N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL <b>9606168</b></p> <p>DÉPARTEMENT DE DÉPÔT <b>75</b></p> <p>DATE DE DÉPÔT <b>17 MAI 1996</b></p>		<p>1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE</p> <p><b>ERNEST GUTMANN - YVES PLASSERAUD S.A. 3, rue Chauveau-Lagarde 75008 PARIS (FRANCE)</b></p>									
<p>2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> brevet d'invention    <input type="checkbox"/> demande divisionnaire</p> <p><input type="checkbox"/> certificat d'utilité    <input type="checkbox"/> transformation d'une demande de brevet européen</p> <p style="text-align: center;">demande initiale</p> <p><input type="checkbox"/> brevet d'invention    <input type="checkbox"/> certificat d'utilité n°</p>		<p>n° du pouvoir permanent : références du correspondant : <b>B 3 1 6 8 A</b>    téléphone :</p>									
<p>Établissement du rapport de recherche    <input checked="" type="checkbox"/> différé    <input type="checkbox"/> immédiat</p> <p>Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance    <input type="checkbox"/> oui    <input type="checkbox"/> non</p>											
<p>Titre de l'invention (200 caractères maximum)</p> <p><b>IDENTIFICATION ET CLONAGE D'UN ANTIGÈNE MYCOBACTÉRIEN CORRESPONDANT A UNE HÉMAGGLUTININE DE LIAISON A L'HÉPARINE.</b></p>											
<p>3 DEMANDEUR (S)    n° SIREN :    code APE-NAF :</p> <p>Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination</p> <p><b>1) INSTITUT PASTEUR DE LILLE</b></p> <p><b>2) INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE</b></p>		<p>Forme juridique</p> <p><b>1) Fondation privée reconnue d'utilité publique</b></p> <p><b>2) Etablissement public</b></p>									
<p>Nationalité (s) <b>françaises</b></p>											
<p>Adresse (s) complète (s)</p> <p><b>1) 1, rue du Professeur Calmette 59019 LILLE CEDEX</b></p> <p><b>2) 101, rue de Tolbiac 75654 PARIS CEDEX 13</b></p>		<p>Pays</p> <p><b>FRANCE</b></p> <p><b>FRANCE</b></p>									
<p>4 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont les demandeurs    <input type="checkbox"/> oui    <input checked="" type="checkbox"/> non    Si la réponse est non, fournir une désignation séparée</p>											
<p>5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES    <input type="checkbox"/> requise pour la 1ère fois    <input type="checkbox"/> requise antérieurement au dépôt ; joindre copie de la décision d'admission</p>											
<p>6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE</p> <table style="width:100%; border: none;"> <tr> <td style="width:33%; border: none;">pays d'origine</td> <td style="width:33%; border: none;">numéro</td> <td style="width:33%; border: none;">date de dépôt</td> <td style="width:33%; border: none;">nature de la demande</td> </tr> <tr> <td style="border: none; height: 100px;"></td> <td style="border: none;"></td> <td style="border: none;"></td> <td style="border: none;"></td> </tr> </table>				pays d'origine	numéro	date de dépôt	nature de la demande				
pays d'origine	numéro	date de dépôt	nature de la demande								
<p>7 DIVISIONS antérieures à la présente demande    n°    date    n°    date</p>											
<p>8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (nom et qualité du signataire - n° d'inscription)</p> <p><b>ERNEST GUTMANN - YVES PLASSERAUD S.A. DESAIX    N° 93-3806</b></p>		<p>SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION</p> <p>SIGNATURE APRES ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI</p>									

**DÉSIGNATION DE L'INVENTEUR**

(si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

N° d'enregistrement national

2606168

**Titre de l'invention : IDENTIFICATION ET CLONAGE D'UN ANTIGÈNE MYCOBACTÉRIEN  
CORRESPONDANT À UNE HÉMAGGLUTININE DE LIAISON À L'HÉPARINE.**

**Le (s) soussigné (s)**

ERNEST GUTMANN - YVES  
PLASSERAUD S.A.  
3, rue Chauveau-Lagarde  
75008 PARIS (FRANCE)

**désigne (nt) en tant qu'inventeur (s)** (indiquer nom, prénoms, adresse et souligner le nom  
patronymique) :

1) MENOZZI Franco  
29, rue des Canadiens  
7022 MONS-HYON  
BELGIQUE

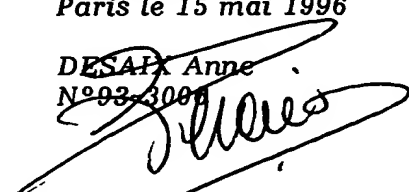
2) LOCHT Camille  
14, rue du Vert Pré  
59830 WANNEHAIN  
FRANCE

**NOTA :** A titre exceptionnel, le nom de l'inventeur peut être suivi de celui de la société à laquelle il appartient  
(société d'appartenance) lorsque celle-ci est différente de la société déposante ou titulaire.

Date et signature (s) du (des) demandeur (s) ou du mandataire  
Paris le 15 mai 1996

DESATX Anne

N°93-3000





# DOCUMENT COMPORTANT DES MODIFICATIONS

PAGE(S) DE LA DESCRIPTION OU DES REVENDI- CATIONS OU PLANCHE(S) DE DESSIN			R.M.*	DATE DE LA CORRESPONDANCE	TAMPON DATEUR DU CORRECTEUR
Modifiée(s)	Supprimée(s)	Ajoutée(s)			
34 et 37	38		X	9/09/96	11 SEP. 1996 - S R
Descriptions					
34 et 37		38	X	22/11/96	27 NOV. 1996 - S R
31 et 38			X	17/02/98	23 FEV. 1998 - S R

Un changement apporté à la rédaction des revendications d'origine, sauf si celui-ci découle des dispositions de l'article 28 du décret du 19 septembre 1979, est signalé par la mention "R.M." (revendications modifiées).

**IDENTIFICATION ET CLONAGE D'UN ANTIGENE MYCOBACTERIEN  
CORRESPONDANT A UNE HEMAGGLUTININE DE LIAISON A  
L'HEPARINE**

5 L'invention concerne des séquences peptidiques permettant l'adhérence de mycobactéries à des cellules hôtes, notamment à des cellules épithéliales. Plus particulièrement, l'invention concerne un antigène mycobactérien de type hémagglutinine de liaison à l'héparine (HBHA) obtenu à partir de *Mycobacterium bovis* BCG ou *Mycobacterium tuberculosis*.  
10 L'invention concerne aussi une séquence peptidique recombinante permettant l'adhérence de mycobactéries à des cellules hôtes. L'invention concerne notamment le produit d'expression d'une souche *Escherichia coli* transformée avec une séquence nucléotidique codant pour une protéine permettant l'adhérence de mycobactéries à ces  
15 cellules hôtes. Ces séquences peptidiques peuvent être utilisées dans des compositions immunogènes, pour la préparation de vaccins contre les infections mycobactériennes, et pour le diagnostic sérologique d'infections mycobactériennes.

L'invention concerne également une séquence nucléotidique  
20 codant pour une séquence peptidique permettant l'adhérence de mycobactéries à des cellules hôtes, et plus particulièrement une séquence nucléotidique codant pour un antigène mycobactérien de type hémagglutinine de liaison à l'héparine (HBHA). L'invention concerne également des vecteurs recombinants comprenant ladite séquence  
25 nucléotidique ainsi que l'utilisation de ces vecteurs pour l'obtention d'hôtes cellulaires recombinants pouvant être utilisés en thérapie, notamment en thérapie anticancéreuse.

Les mycobactéries sont parmi les microorganismes pathogènes les plus importants qui causent des maladies aussi bien chez  
30 l'homme que chez l'animal. Les infections mycobactériennes sont toujours parmi les premières causes de mortalité dans le monde. La tuberculose

humaine, causée par *Mycobacterium tuberculosis*, conduit à elle seule à approximativement 3 millions de morts chaque année (1, 2). *Mycobacterium bovis* cause la tuberculose chez les bovins, mais il est également très virulent pour l'homme. La lèpre, causée par *Mycobacterium leprae*, reste un problème majeur de santé non résolu dans les pays en

5 voie de développement (3).

Les infections par des membres du complexe *Mycobacterium avium-intracellulare* causent des maladies chez les oiseaux et le porc et sont parmi les infections opportunistes les plus fréquentes que l'on trouve

10 chez les patients atteints du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA) (4, 5). En outre, la récente réapparition dramatique de la tuberculose dans les pays développés ainsi que l'apparition et la propagation de souches de *M. tuberculosis* résistantes aux médicaments (6) soulignent la difficulté de contrôler les maladies mycobactériennes.

La caractérisation moléculaire des diverses étapes dans la pathogenèse des maladies mycobactériennes est fondamentale pour le développement d'approches thérapeutiques et prophylactiques rationnelles et optimisées contre ces maladies. Les facteurs de virulence sont souvent

15 de bons antigènes pouvant être utilisés à titre de candidats-vaccins. En dépit de l'importance des infections mycobactériennes, on connaît peu de choses au sujet des mécanismes moléculaires de base impliqués dans leur

20 pathogenèse (7).

L'un des événements initiaux et cruciaux dans la pathogenèse bactérienne est l'adhérence du microorganisme à ses tissus

25 cibles. Les mycobactéries présentent un tropisme pour les macrophages pulmonaires (8). Toutefois, dans la mesure où ces microorganismes sont facilement transmis par aérosol, les premières structures de l'hôte qu'ils rencontrent au cours de l'infection sont celles de l'épithélium respiratoire. Par conséquent, les interactions avec les cellules épithéliales ou avec la

30 matrice extracellulaire (MEC) pendant les étapes initiales et ultérieures de

la pathogénèse peuvent être importantes (9), bien qu'elles n'aient pas encore été étudiées de manière poussée.

Dans le contexte de la présente invention, les inventeurs ont obtenu un nouvel antigène mycobactérien impliqué dans l'adhérence de mycobactéries à des cellules hôtes de type épithéliale. Il s'agit d'une hémagglutinine de liaison à l'héparine (heparin binding hemagglutinin (HBHA)) de 28 kDa qui a été obtenue à partir de surnageants de culture et de préparation des parois cellulaires de *Mycobacterium bovis* BCG et de *Mycobacterium tuberculosis*. Les analyses par immunoempreintes à l'aide d'anticorps polyclonaux et monoclonaux ont indiqué que l'HBHA est différente des protéines du complexe de l'antigène 85 et représente un nouvel antigène. A partir de cette protéine de base, les inventeurs ont pu évaluer et proposer le développement d'une série de séquences peptidiques pouvant être utilisées en diagnostic, en thérapie et en prophylaxie.

L'invention concerne donc une séquence peptidique permettant l'adhérence de mycobactéries à des cellules hôtes, notamment des cellules épithéliales. Plus particulièrement, la séquence peptidique de l'invention est caractérisée en ce qu'il s'agit d'un antigène mycobactérien de type hémagglutinine de liaison à l'héparine (HBHA), notamment un antigène obtenu à partir de *Mycobacterium bovis* BCG ou *Mycobacterium tuberculosis*.

Dans une des réalisations préférées de la présente invention, la séquence peptidique est caractérisée en ce qu'elle comprend la séquence correspondant à la séquence de la figure 10, ou tout variant de cette séquence permettant l'adhérence de mycobactéries à des cellules hôtes et obtenu par addition, substitution ou délétion d'un ou plusieurs acides aminés de la séquence de la figure 10

De façon préférée, l'invention concerne plus particulièrement une séquence peptidique comprenant une région impliquée dans les

interactions avec les glycoconjugués sulfatés et dans la liaison à l'héparine. Cette séquence peptidique est la suivante :

LRERAETRTDTRSRVEESRARLTKLQEDLPEQLTELK.

5 Les régions particulièrement utilisées sont situées en début, en milieu et en fin de chaîne et contiennent entre 7 et 15 acides aminés.

L'invention concerne également une séquence peptidique comprenant la portion C-terminale de la séquence de la figure 10 et plus particulièrement les séquences comprenant approximativement les 10 à 50  
10 derniers acides aminés de la portion C-terminale de la séquence de la figure 10. Cette région de la séquence de la figure 10 est impliquée dans le mécanisme d'ancrage de la protéine sur la bactérie bien qu'une séquence plus courte, notamment d'environ 10 à 20 acides aminés, est suffisante pour permettre l'ancrage de la protéine.

15 Les inventeurs ont également exprimé la séquence nucléotidique codant pour la séquence peptidique de l'invention chez *E. coli*. Le polypeptide obtenu présente un poids moléculaire plus faible que celui de la protéine purifiée à partir de *M. bovis* BCG ou *M. tuberculosis*. Ces différences sont le résultat de modifications post-  
20 traductionnelles non réalisées dans *E. coli*.

L'invention concerne donc également une séquence peptidique recombinante, caractérisée en ce qu'elle permet l'adhérence de mycobactéries à des cellules hôtes. Plus particulièrement, la séquence recombinante de la présente invention est le produit d'expression d'une  
25 séquence nucléotidique codant pour une séquence peptidique permettant l'adhérence de mycobactéries à des cellules hôtes et notamment une séquence antigénique obtenue à partir de *M. bovis* BCG et *M. tuberculosis*, ladite séquence recombinante étant par exemple le produit d'expression d'une souche *E. coli* transformée avec une séquence nucléotidique  
30 appropriée.

L'invention concerne également l'utilisation de l'une des séquences peptidiques décrites précédemment, qu'elle soit recombinante ou non, pour le diagnostic sérologique de la présence de mycobactéries. L'invention concerne également une composition immunogène caractérisée en ce qu'elle comprend l'une des séquences peptidiques décrites précédemment ainsi que l'utilisation de cette séquence peptidique pour la préparation de vaccins contre les infections mycobactériennes, particulièrement les infections causées par *M. bovis* BCG ou *M. tuberculosis*.

Les inventeurs ont également découvert que l'adhérence de mycobactéries à des cellules épithéliales pouvait être inhibée spécifiquement par des glucides sulfatés. L'invention concerne donc l'utilisation d'un glucide sulfaté pour inhiber l'adhérence de mycobactéries à des cellules épithéliales. Les glucides sulfatés particulièrement intéressants comprennent l'héparine, la chondroïtine sulfate et le dextran sulfate ainsi que leurs dérivés synthétiques.

Les inventeurs ont également isolé l'ensemble du gène codant pour l'HBHA de l'ADN de *M. bovis* BCG. L'invention concerne donc une séquence nucléotidique caractérisée en ce qu'elle code pour une séquence peptidique permettant l'adhérence de mycobactéries à des cellules hôtes. Plus particulièrement, la séquence nucléotidique de l'invention code pour un antigène mycobactérien de type hémagglutinine de liaison à l'héparine (HBHA) notamment la séquence peptidique de la figure 10 ou toute portion de cette séquence peptidique permettant l'adhérence de mycobactéries à des cellules hôtes et obtenue par addition, substitution ou délétion d'un ou plusieurs acides aminés de ladite séquence peptidique.

L'invention concerne également un hôte cellulaire recombinant, caractérisé en ce qu'il comprend dans son génome une des séquences nucléotidiques décrites précédemment. Dans une des réalisations préférentielles de l'invention, l'hôte cellulaire recombinant mais

non exclusif est le BCG pour lequel des vecteurs d'expression directement utilisables pour le développement de BCG recombinants utilisables chez l'homme ou l'animal ont été développés.

5 Le BCG est utilisé en thérapie, plus particulièrement en  
thérapie anti-cancéreuse et notamment contre les cancers superficiels de  
la vessie. Dans ce type d'application thérapeutique, il semblerait exister  
une corrélation entre la faculté d'adhérence du BCG et son pouvoir anti-  
tumoral. Dans le contexte de la présente invention, l'identification de la  
HBHA et le clonage de son gène rendent possible une augmentation de la  
10 capacité d'adhérence via une surexpression du gène codant la HBHA.

La description de la présente invention sera effectuée en se  
référant aux figures suivantes :

- 15 - la figure 1 représente l'effet de glucides sulfatés et non  
sulfatés sur l'adhérence mycobactérienne aux cellules CHO et aux  
macrophages;
- la figure 2 représente les données démontrant la purification  
d'une protéine de liaison d'héparine de *M. bovis* BCG;
- la figure 3 représente une comparaison de la protéine de  
liaison à l'héparine de *M. bovis* avec le complexe d'antigène 85;
- 20 - la figure 4 représente l'effet de glucides sulfatés et non  
sulfatés sur l'hémagglutination induite par HBHA;
- la figure 5 représente l'inhibition de l'adhérence de BCG aux  
cellules CHO par des anticorps anti-HBHA;
- la figure 6 représente des analyses par immunoempreintes  
25 effectuées avec des anti-sérums de tuberculeux;
- la figure 7 représente la séquence nucléotidique et la  
séquence d'acides aminés d'un fragment de HBHA déduite à partir d'un  
fragment PCR de l'ADN chromosomique de BCG;
- la figure 8 représente une analyse par Southern-blot de  
30 l'ADN chromosomique de BCG;

- la figure 9 représente la stratégie de séquençage du gène codant pour HBHA;

- la figure 10 représente la séquence d'ADN du gène codant pour HBHA;

- la figure 11 représente l'analyse par électrophorèse en gel polyacrylamide et par immunoblotting de l'expression de la 3HA chez *E. coli*.

### Description détaillée de l'invention

#### **Inhibition de l'adhérence mycobactérienne aux cellules épithéliales par des glucides sulfatés.**

L'invention concerne l'utilisation de glucides sulfatés pour inhiber l'adhérence de mycobactéries à des cellules épithéliales. Pour démontrer que les mycobactéries peuvent adhérer par l'intermédiaire des glucides sulfatés, les inventeurs ont testé si des polysaccharides sulfatés sont capables de réduire l'adhérence de *M. bovis* BCG aux cellules épithéliales.

Des *M. bovis* (BCG) (souche 1173P2, OMS, Suède, passages 3 à 8) en croissance exponentielle ont été cultivant les mycobactéries pendant trois jours dans du milieu contenant 5 µCi/ml [6-<sup>3</sup>H]uracile (New England Nuclear, 24 Ci/mole). Les mycobactéries ont ensuite été récoltées par centrifugation pendant 5 min), lavées deux fois par du tampon phosphate Dulbecco (DPBS) et remises en suspension dans du milieu RPMI 1640 contenant 300 mg/l L-glutamine (GIBCO), dépourvu de veau foetal (RPMI).

La veille de l'essai d'adhérence, les puits des plaques de culture de tissus à 24 puits (Nunc, Nunc, Danemark) ont été inoculés avec 10<sup>5</sup> cellules d'ovaires de hamsters Chinois (CHO) extemporanément (voir figures 1A et 1B, barres grises) ou des macrophages J774A.1 (ATCC TIB67) (voir figure 1B, barres noires) remis

du gène

de BCG

se en gel

3HA chez

épithéliales

atés pour

les. Pour

diaire des

s sulfatés

BCG aux

Stockholm,

arqués en

de Sauton

mole). Les

3000 x g

salin de

de culture

de sérum

plaques de

é inoculés

cultivées

ou des

ires) remis



en suspension dans 2 ml de RPMI additionnés de 10 % (v/v) de sérum de veau foetal décomplémenté (RPMI-SVF). Juste avant l'essai, les cellules ont été lavées trois fois par 2 ml de RPMI, et on a ajouté à chaque puits 1 ml de suspension mycobactérienne dans du RPMI pour obtenir une multiplicité d'infection de 10 bactéries par cellule eucaryote.

L'essai d'adhérence a été réalisé en présence de concentrations croissantes de D(+)galactose (Sigma) (voir figure 1A, cercles noirs) ou d'héparine de la muqueuse intestinale porcine ( $M_r$  6 kDa, Sigma) (voir figure 1A, cercles blancs), ou avec 20  $\mu$ g/ml des glucides indiqués (Sigma) (voir figure 1B). Après 6 heures d'incubation à 37°C dans une atmosphère contenant 5 % de CO<sub>2</sub>, les cellules ont été lavées trois fois par 2 ml de DPBS, et enfin lysées par l'addition de 1 ml d'eau distillée contenant 0,1 % (p/v) de déoxycholate de sodium. La radioactivité associée aux lysats cellulaires a été comptée en utilisant un compteur à scintillation liquide (Beckman, modèle LS 6000SC). L'adhérence résiduelle est exprimée en pourcentage de coups radioactifs par minute par rapport aux coups obtenus en l'absence du glucide. Les données des figures 1A et 1B représentent les moyennes d'expériences réalisées en quadruple, et les barres d'écart type sont représentées.

Comme le montre la fig. 1A, de faibles concentrations d'héparine ont inhibé sensiblement l'adhérence aux cellules CHO des BCG marqués par [<sup>3</sup>H]uracile, alors que le galactose jusqu'à 100  $\mu$ g/ml n'a pas eu d'effet significatif. Du dextran sulfate, du fucoïdane et de la chondroïtine sulfate ont pu réduire l'adhérence, mais aucune inhibition significative n'a pu être observée avec du mannose ou du dextran non sulfaté, même aux plus fortes concentrations testées (1 mg/ml).

Ces résultats confirment que les mycobactéries possèdent à leur surface une adhésine majeure de liaison des glucides sulfatés. Toutefois, comme l'inhibition de l'adhérence n'a pas dépassé 70 %, d'autres composants sont impliqués dans ce processus. De façon intéressante, les interactions de BCG avec les macrophages J774A.1 n'ont

pas été affectées par les glucides sulfatés, ni par les sucres non sulfatés (fig. 1B), même à des concentrations allant jusqu'à 1 mg/ml (résultats non présentés). Ceci est en accord avec des rapports précédents mettant en cause les récepteurs au complément CR1, CR3 et CR4 comme ligands mycobactériens à la surface des monocytes sanguins et des macrophages alvéolaires.

**Purification d'une protéine de liaison à l'héparine présente chez *M. bovis* BCG et de *M. tuberculosis*.**

L'invention concerne une séquence peptidique permettant l'adhérence de mycobactéries à des cellules hôtes. L'inhibition de l'adhérence de BCG aux cellules épithéliales par des sucres sulfatés suggérait déjà que les mycobactéries expriment une adhésine qui interagit avec des glycoconjugués sulfatés, tels des glycoprotéines ou glycolipides sulfatés, présents à la surface des cellules hôtes. Pour identifier les adhésines en question, des surnageants de culture de BCG ont été fractionnés par chromatographie sur héparine-Sépharose.

Des *M. bovis* BCG ont été cultivés à 37°C en cultures statiques dans des fioles de Roux de 175 cm<sup>2</sup> (Falcon, Becton-Dickinson) contenant approximativement 150 ml de milieu de Sauton. A la phase stationnaire, les cultures ont été centrifugées (10.000 x g pendant 20 minutes), et on a chargé 500 ml de surnageant sur une colonne (1 x 5 cm) d'héparine-Sépharose CL-6B (Pharmacia) équilibrée avec du DPBS. La colonne a ensuite été lavée par 100 ml de DPBS, et les molécules retenues ont été éluées par un gradient linéaire de NaCl 0-500 mM dans 100 ml de DPBS. Le débit pendant toutes les étapes a été maintenu à 1,5 ml/min., et on a suivi en continu l'absorbance à 280 nm de l'éluat qui fut récolté par fractions de 1 ml. Ces fractions furent analysées par SDS-PAGE en utilisant un gel à 12 % suivi d'une coloration au Bleu Brillant de Coomassie R-250.

Les fractions analysées après le début du gradient sont montrées dans les voies 1-8 de la figure 2. Les voies de droite montrent la protéine de liaison à l'héparine purifiée à partir d'une préparation de parois cellulaires de *M. bovis* BCG. Les tailles des marqueurs de  $M_r$  exprimées en kDa sont données dans la marge de droite.

Comme le montre la fig. 2, une protéine unique de 28 kDa élue à approximativement 350 mM de NaCl. L'interaction entre cette protéine et l'héparine est dépendante de la sulfatation du sucre car celle-ci pouvait également être purifiée en utilisant des billes de dextran sulfate, mais pas des billes de dextran (non présenté). La même protéine de liaison à l'héparine a également été purifiée à partir des filtrats de culture de *M. tuberculosis*.

L'obtention de deux protéines de liaison à l'héparine semblables à partir de deux souches mycobactériennes différentes confirme que des protéines de ce type sont présentes dans la plupart des souches mycobactériennes pathogènes. Des pourcentages d'homologie inférieurs à 100% peuvent conduire à des différences structurales, bien que les propriétés fondamentales de ces protéines n'en soient pas affectées. L'invention concerne donc également les protéines de liaison à l'héparine ayant une structure apparentée à la protéine isolée et pouvant être obtenues à partir de leurs propriétés d'adhérence à des glucides sulfatés. Ces protéines peuvent se distinguer de la protéine de l'invention par des additions, substitutions et délétions d'acides aminés sans que cela n'affecte de façon substantielle leurs propriétés d'adhérence aux cellules épithéliales.

### **Localisation à la surface cellulaire de la protéine mycobactérienne de liaison à l'héparine.**

Pour déterminer si cette protéine est une protéine strictement sécrétée ou si elle peut être associée à la surface mycobactérienne, des fractions de parois cellulaires ont été préparées à partir de BCG, puis soumises à une chromatographie sur héparine-Sépharose.

Pour les préparations de parois cellulaires, les mycobactéries ont été cultivées dans 2 litres de milieu de Sauton ou encore de milieu synthétique de Long (Quality Biological Inc., Gaithersburg, MD) pendant 12 à 14 jours. Les bactéries ont ensuite été récoltées par centrifugation, lavées une fois dans du DPBS contenant 0,05 % (v:v) de Tween 80 (DPBS/Tw), remises en suspension dans 100 ml de DPBS/Tw et chauffées à 80°C pendant 1 heure. Les bactéries ont été centrifugées à 13.000 x g pendant 20 min., lavées par du DPBS/Tw, remises en suspension dans 25 ml de DPBS/Tw contenant 5 mM d'inhibiteur de protéase AEBSF, Rnase A et Dnase I, soniquées de façon intermittente pendant 25 min., puis centrifugées pendant 13.000 x g pendant 20 min. Cette étape a été répétée, et les surnageants ont été réunis et centrifugés à 34.000 x g pendant 3 heures à 4°C. Le culot a été jeté et le surnageant final dilué 1:2 dans du DPBS et chromatographié sur héparine-Sépharose CL-6B.

Comme le montre la fig. 2, la protéine de liaison à l'héparine de 28 kDa était également présente dans ces préparations, ce qui confirme qu'elle est associée à la surface. Elle était également présente dans des fractions de parois cellulaires de *M. tuberculosis* et des préparations de tuberculine (dérivé protéique purifié antigène pour cutiréaction) dérivées de *M. tuberculosis*.

### **Activité d'hémagglutination de la protéine de liaison à l'héparine mycobactérienne.**

La capacité des adhésines bactériennes à agglutiner les globules rouges est souvent utilisée comme modèle pour étudier la fixation

microbienne à la manière des lectines au récepteur des cellules eucaryotes. Les inventeurs ont par conséquent testé la protéine de liaison à l'héparine purifiée pour sa capacité à agglutiner des érythrocytes.

5 L'activité d'hémagglutination de la protéine de liaison à l'héparine purifiée de surnageants de culture a été dosée dans des plaques de microtitration en U (Falcon) en l'absence ou en présence d'héparine (figure 4, carrés noirs) de la muqueuse intestinale porcine, de dextran sulfate (figure 4, cercles noirs) ou de dextran (figure 4, cercles blancs) à des concentrations allant de 0 à 50 µg/ml. Des essais standard  
10 contenaient 70 µl d'une suspension fraîche d'érythrocytes de lapin préparée dans du DPBS et 70 µl d'HBHA purifiée correspondant à 1 µg de protéine. Les titres d'hémagglutination ont été lus après 5 heures d'incubation à température ambiante. Les données représentent des moyennes pour des expériences en quadruple, et les barres d'écart types  
15 sont montrées.

Moins de 0,1 µg de protéine purifiée a pu induire l'hémagglutination d'érythrocytes de lapin, mais pas d'érythrocytes d'humain, de mouton, d'oie ou de poulet (données non présentées). C'est pour cette raison que les inventeurs ont désigné cette protéine comme  
20 étant une hémagglutinine de liaison à l'héparine (HBHA). L'hémagglutination induite par HBHA a été inhibée par l'héparine ou le dextran sulfate, mais pas par le dextran (voir fig. 4), ce qui est similaire aux résultats obtenus dans l'essai d'adhérence des mycobactéries aux cellules CHO. L'activité d'hémagglutination est sensible à la chaleur dans la  
25 mesure où l'incubation de la protéine pendant 60 min à 80°C a aboli l'hémagglutination.

**Inhibition des activités d'hémagglutination et d'adhérence provenant de la médiation par HBHA, par des anticorps polyclonaux et monoclonaux spécifiques.**

Dans la mesure où d'une part l'adhérence mycobactérienne aux cellules épithéliales est inhibée par des glucides sulfatés, et d'autre part une protéine de 28 kDa était purifiée par chromatographie sur héparine-Sépharose, il était important d'établir si l'adhérence mycobactérienne provenait de la médiation par HBHA.

Par conséquent, des anticorps polyclonaux de rat anti-HBHA ont été préparés de la manière suivante: 200 µg d'HBHA de BCG purifiée ont été soumis à l'électrophorèse préparative sur un gel de polyacrylamide à 15 % en présence de SDS, puis électro-transférés sur une membrane de nitrocellulose. Après une coloration rapide au rouge ponceau, les bandes correspondantes à l'HBHA ont été excisées avec précaution, découpées en petits carrés et soniquées brièvement dans 1,5 ml de PBS stérile. Après l'addition de 1 ml d'une solution de monophosphoryle-lipide A (MPL + Système Adjuvant TDM, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) préparée selon la recommandation du fabricant, deux rats Fischer ont été immunisés chacun avec 1 ml de la suspension d'antigène. Pour chaque immunisation, on a administré 400 µl par voie intrapéritonéale et deux fois 300 µl par voie sous-cutanée. Les animaux ont reçu des rappels de la même manière avec la même quantité d'antigène un mois plus tard, et le sérum a été récupéré 3 semaines après le rappel.

Le BCG a été marqué par [6-<sup>3</sup>H]uracile comme décrit ci-dessus. Approximativement  $4 \cdot 10^6$  BCG radiomarqués ont été remis en suspension dans 1 ml de PBS et préincubés avec les volumes indiqués de liquides ascétiques d'anticorps monoclonal 3921E4 anti-HBHA (figure 5, panneau A), ou avec 250 µl d'antisérum polyclonal de rat anti-HBHA (sérum immunitaire, figure 5, panneau B) ou de sérum naïf (figure 5, sérum témoin, panneau B) pendant 30 min. à température ambiante. Les suspensions bactériennes ont ensuite été lavées deux fois par 2 ml de

DPBS pour éliminer les anticorps non liés, puis utilisées dans l'essai d'adhérence de cellules CHO à une multiplicité d'infection de 10, comme décrit précédemment.

5 Comme le montre la fig. 5, l'adhérence de BCG aux cellules CHO a été sensiblement inhibée d'une manière dose-dépendante par la présence d'anticorps anti-HBHA. Les liquides ascétiques contenant des anticorps monoclonaux non pertinents ou des antisérums naïfs n'ont eu aucun effet. Ces observations indiquent que l'adhérence des mycobactéries aux cellules épithéliales provient en partie de la médiation  
10 par HBHA.

#### **Réactivité immunitaire vis-à-vis d'HBHA par des antisérums des tuberculeux**

Pour savoir si HBHA est capable d'induire une réponse  
15 immunitaire chez l'homme, des analyses d'immunoempreintes ont été réalisées en utilisant de l'HBHA purifiée et des antisérums humains provenant de tuberculeux. Cinq µg de la protéine ont été soumis à l'électrophorèse en utilisant un gel de polyacrylamide-SDS à 15 %, puis transférés sur des membranes de nitrocelluloses sondées ultérieurement  
20 avec les sérums dilués 100 fois provenant de 7 patients différents atteints de tuberculose évolutive (voir figure 6, voies 3A à 493) (voie 1, HBHA purifiées, voie 2, protéine non pertinente), ainsi que le sérum d'un sujet sain (voie témoin). Les voies de gauche contiennent les protéines purifiées (voies 1 et 2) et les marqueurs de poids moléculaire (voir PM) ont été  
25 colorés au bleu de Coomassie après SDS-PAGE.

Les résultats présentés à la fig. 6 montrent que tous les sérums des tuberculeux contiennent des anticorps anti-HBHA, alors que le sérum de l'individu sain ne contenait pas de tels anticorps. Ces résultats indiquent que l'HBHA exposée à la surface est immunogène pendant  
30 l'évolution de la tuberculose humaine et que la présence d'anticorps anti-HBHA permet de déterminer la présence d'infections mycobactériennes.

L'invention concerne donc l'utilisation de la séquence peptidique de l'invention, et particulièrement une ou plusieurs régions immunogènes de cette séquence, dans le diagnostic d'infections mycobactériennes, notamment par la mise en évidence de la présence d'anticorps anti-HBHA dans des fluides biologiques. De façon générale, une séquence peptidique ou une séquence peptidique recombinante selon l'invention est liée à un support et incubée avec des fluides biologiques susceptibles de contenir des anticorps anti-HBHA. Les anticorps anti-HBHA liés à la séquence peptidique de l'invention sont ensuite mis en évidence soit par exemple avec des anticorps marqués dirigés contre les anticorps anti-HBHA, soit avec des anticorps non marqués dirigés contre les anticorps anti-HBHA et des anticorps marqués par exemple par une enzyme de type phosphatase alcaline ou peroxidase, ou de la biotine dirigés contre les anticorps non marqués.

De façon détaillée, la séquence complète de la séquence peptidique ou la séquence peptidique recombinante de l'invention peut être utilisée mais on peut également utiliser une ou plusieurs régions immunogènes de cette séquence qui peuvent être déterminées par des techniques dites d'« épitope mapping » bien connues de la personne versée dans l'art. Par exemple, en vue de cartographier les épitopes B et T présents dans la molécule de HBHA complète, on a recours à la méthode des profils d'hydrophobicité (33). La prédiction informatisée de déterminants antigéniques pour cellules B est aussi utilisée (34).

La séquence peptidique choisie est adsorbée sur un support de type plaque de microtitration, canule, microbille ou autre. La fixation de la séquence peptidique est effectuée en utilisant des techniques connues de la personne versée dans l'art. De façon préférée, le support utilisé est une plaque de microtitration. La séquence peptidique est donc diluée dans un tampon carbonate basique et distribuée dans les puits. Après une incubation de quelques heures à température ambiante, on effectue plusieurs lavages en utilisant un tampon physiologique.



La séquence peptidique fixée au support est ensuite incubée avec un échantillon de fluide biologique. Plusieurs types de fluides biologiques peuvent être utilisés et obtenus à partir d'animaux ou d'humains. Plus particulièrement, le fluide biologique peut être obtenu à partir de sérum, de lymph, de salive ou d'urine ou encore isolé à partir de tissus telles les cellules de poumons. L'incubation se fait selon les procédés habituels. Ici, les sérums de patient sont dilués et mis en contact avec la séquence peptidique fixée sur la plaque. L'incubation d'environ une heure est suivie de plusieurs lavages avec un tampon physiologique. Les anticorps anti-HBHA liés à la séquence peptidique de l'invention sont ensuite mis en évidence soit avec des anticorps marqués dirigés contre les anticorps anti-HBHA, soit avec des anticorps non marqués dirigés contre les anticorps anti-HBHA puis avec des anticorps marqués dirigés contre les anticorps non marqués.

Le marquage des anticorps peut être radioactif mais on préférera de façon générale un autre type de marquage habituel. Les substances fluorescentes telle que l'ésithiocyanatefluoriscine ou les enzymes tels que la phosphatase alcaline, la peroxydase ou la biotine/streptavidine sont des marqueurs communément utilisés. Le choix des anticorps marqués ou non marqués dépend de l'animal duquel proviennent les liquides biologiques. S'il s'agit de liquide biologique humain, les anticorps utilisés sont dirigés contre des immunoglobulines humaines.

La liaison entre l'anticorps anti-HBHA et les anticorps marqués ou non marqués s'effectue selon les techniques habituelles. Par exemple, la réaction a lieu pendant une heure à température ambiante et après plusieurs lavages, un substrat du marqueur est ajouté.

L'invention concerne également un kit permettant de détecter la présence d'anticorps anti-HBHA dans un échantillon de fluide biologique. Le kit comprend une séquence peptidique, une séquence peptidique recombinante ou une ou plusieurs régions immunogènes de

cette séquence adsorbée sur un support et de façon optionnelle, un anticorps marqué (et si nécessaire un anticorps non marqué) ainsi que les tampons habituels et un substrat du marqueur.

## 5 Etude des caractéristiques de HBHA.

Comme la taille de cette protéine est proche de celle des protéines de liaison de fibronectine du complexe d'antigène 85 (12), des analyses Western-blot ont été utilisées pour déterminer si elles étaient apparentées.

10 La protéine de liaison à l'héparine purifiée d'une préparation de paroi cellulaire de *M. bovis* BCG (figure 3, voies 1) ou de surnageant de culture (voies 2) a été comparée avec le complexe d'antigène 85 purifié (voies 3) par analyse d'immunoempreinte (panneaux A, B, C) et coloration au Bleu de Coomassie (panneau D) après SDS-PAGE. L'analyse par  
15 immunoempreinte a été effectuée en utilisant des anticorps polyclonaux dressés contre la protéine de liaison à l'héparine purifiée (panneau A), l'anticorps monoclonal 4057D2 (panneau B), ou les anticorps polyclonaux dressés contre le complexe d'antigène 85 (panneau C). Les voies 1 et 2 des panneaux A, B, et C contiennent 2 µg de protéine purifiée, les voies 3 des panneaux A, B et C contiennent 7 µg de protéine purifiée, les voies 2  
20 et 3 du panneau D contiennent 4 µg et 15 µg de protéine purifiée respectivement. Les tailles des marqueurs de  $M_r$  sont données dans la marge.

La fig. 3 montre que des anticorps polyclonaux dressés  
25 contre la protéine de liaison à l'héparine de 28 kDa purifiée de BCG n'ont pas reconnu les protéines du complexe d'antigène 85 purifiées. A l'inverse, des anticorps polyclonaux et monoclonaux (non présentés) dressés contre le complexe d'antigène 85 de BCG n'ont pas réussi à reconnaître la protéine de liaison à l'héparine, ce qui implique qu'il s'agit de protéines  
30 distinctes. Ce résultat est également appuyé par les différents profils de migration de ces protéines pendant la SDS-PAGE (fig. 3, panneau D).

Les protéines de liaison à l'héparine purifiées de *M.tuberculosis* H37Ra et de BCG ont été soumises à un séquençage des acides aminés N-terminaux. Pour ce faire, 25 µg d'HBHA ont été soumis à l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide-SDS en utilisant un gel de polyacrylamide à 15 %. Après l'électrophorèse, la matière a été transférée sur une membrane PVDF (ProBlott, ABI) par électroempreinte. Après coloration par le bleu de Coomassie, la bande correspondant à l'HBHA a été excisée et soumise à une dégradation d'Edman automatisée. Les 16 premiers acides aminés étaient Ala-Glu-Asn-Ser-Asn-Ile-Asp-Asp-Ile-Lys-Ala-Pro-Leu-Leu-Ala-Ala. Les 16 premiers acides aminés de la protéine de liaison à l'héparine de BCG ont également été déterminés et se sont avérés identiques à ceux de *M. tuberculosis*. Une recherche de similarité dans les bases de données des protéines a mis en évidence que la protéine de liaison à l'héparine n'avait par été identifiée auparavant, et qu'elle représente par conséquent une nouvelle protéine mycobactérienne. En outre, les 16 premiers acides aminés n'ont présenté aucune similarité de séquence significative par rapport à d'autres séquences de protéines connues.

#### Clonage du gène de BCG codant pour HBHA.

Pour le clonage du gène codant pour HBHA, on a d'abord déterminé les séquences N-terminales des fragments internes de HBHA. Pour cela, de l'HBHA purifiée a été soumise à l'électrophorèse comme décrit précédemment. Après l'électrophorèse, la protéine a été digérée par la trypsine à l'intérieur du gel. Les peptides résultants ont alors été isolés par HPLC en phase inverse, puis soumis à la dégradation d'Edman. Quatre peptides ont permis la détermination de séquence:

Le peptide S 1441:	Lys-Ala-Glu-Gly-Tyr-Leu-Glu-Ala-Ala-Thr
Le peptide S1443:	Xxx-Glu-Gly-Tyr-Val-Asp-Gln-Ala-Val-Glu-Leu-
	Thr-Gln-Glu-Ala-Leu-Gly-Lys
Le peptide S 1446:	Xxx-Gln-Glu-Xxx-Leu-Pro-Glu-Xxx-Leu

Le peptide S 1447: Phe-Thr-Ala-Glu-Glu-Leu-Arg.

La séquence de deux paires d'oligonucléotides était dérivée des séquences peptidiques internes de HBHA. La teneur en G + C généralement forte de l'ADN mycobactérien a conduit les inventeurs à  
5 favoriser G ou C dans la troisième position des codons ("wobble"). Le premier couple d'oligonucléotides provenait du peptide S1441 et avait les séquences suivantes: 5'AAG GC(G/C) GAG GG(G/C) TAC CT 3' (oligo S1441) et 5' AGG TA(G/C) CCC TC(G/C) GCC TT 3' (oligo S1441 inverse). Le deuxième couple d'oligonucléotides provenait du peptide  
10 S1443 et avait les séquences suivantes: 5'GAC CAG GC(G/C) GT(G/C) GAG CT 3' (oligo S1443) et 5' AGC TC(G/C) AC(G/C) GCC TGG TC 3' (oligo S1443 inverse).

L'ADN chromosomique de BCG a été extrait comme décrit par Kremer et al. (23). Les réactions de polymérisation en chaîne (PCR) en  
15 utilisant 50 ng d'ADN chromosomique de BCG et 1 µg soit des oligo S1441 et S1443 inverse, soit des oligo S1443 et S1441 inverse ont été effectuées à une température d'hybridation de 50°C et à un nombre de cycles de PCR de 30. Seule la réaction par PCR effectuée avec les oligonucléotides S1441 et S1443 inverse a donné un fragment d'ADN amplifié spécifique  
20 d'approximativement 150 bp. Ce fragment amplifié était encore observé lorsque la température d'hybridation a été augmentée à 57°C.

Le fragment amplifié a été inséré dans le site *Hind*III de pUC18 (Boehringer, Mannheim) et introduit dans *Escherichia coli* XL1-Blue (New England Biolabs). La teneur en plasmide de *E. coli* recombinant a  
25 ensuite été analysée par des méthodes standard (24), et le plasmide contenant le fragment attendu a été appelé pClone5.

Après purification par chromatographie sur une colonne de Nucleobond AX (Macherey - Nagel) selon les instructions du fournisseur, un fragment d'ADN bicaténaire d'approximativement 150 pb a été  
30 séquencé par la méthode de terminaison d'élongation de chaîne didésoxyribonucléotidique en utilisant du [alpha-<sup>35</sup>S]dCTP (1,000 Ci/mmole;

Amersham) et le kit de séquençage d'ADN de T7 (Pharmacia) selon les instructions du fabricant. La séquence obtenue est présentée à la fig. 7 dans laquelle la séquence des deux oligonucléotides utilisées pour la PCR est soulignée. La séquence d'acides aminés déduite de la séquence d'ADN s'est avérée correspondre aux séquences d'acides aminés déterminées pour les peptides S1441 et S1443. Ceci indiquait que le fragment PCR amplifié correspond à une partie interne du gène de BCG codant pour HBHA.

Pour cloner l'ensemble du gène codant pour HBHA, le fragment de 150 pb de pClone5 a été excisé par digestion par les enzymes de restriction *Bam*HI et *Hind*III. Le fragment a ensuite été purifié par électrophorèse sur un gel de polyacrylamide à 7 % et excisé du gel par électro-élution. Le fragment purifié a été marqué à la digoxigénine en utilisant le kit de détection et de marquage d'ADN par DIG (Boehringer) comme recommandé par le fabricant. Le fragment marqué a ensuite été utilisé dans des expériences de Southern-blot pour sonder l'ADN chromosomique de BCG digéré par *Bam*HI (figure 8, voie 1), *Eco*RI (figure 8, voie 2), *Pst*I (figure 8, voie 3), *Sma*I (figure 8, voie 4), *Acc*I (figure 8, voie 5), *Nco*I (figure 8, voie 6), *Not*I (figure 8, voie 7), *Sac*I (figure 8, voie 8) ou *Sph*I (figure 8, voie 9), soumis à une électrophorèse sur agarose et transféré sur une membrane de nylon. La membrane a ensuite été sondée avec le fragment *Bam*HI/*Hind*III d'approximativement 150 pb de pClone5. Les tailles de marqueurs sont montrées dans la marge de droite. Des analyses de Southern-blot ont été effectuées en utilisant des protocoles standard (24). Comme le montre la fig. 8, la digestion par *Sph*I de l'ADN chromosomique de BCG a donné un fragment unique d'environ 2,5 kb qui s'hybridait avec la sonde.

Les fragments de restriction *Sph*I de l'ADN chromosomique de BCG de 2,3 à 2,7 kb ont alors été purifiés par électrophorèse préparative et électro-élution, et insérés dans le site *Sph*I de pUC18. Les plasmides recombinants ont été utilisés pour transformer *E. coli* XL1-Blue.

Des colonies blanches cultivées sur gélose LB (24) additionnées d'ampicilline (150 µg/ml) d'iso-propyl-thiogalactopyrannoside (IPTG, 40 µg/ml) et de X-gal (40 µg/ml) ont été analysées par hybridation sur colonies en utilisant la sonde marquée à la digoxigénine. Parmi  
 5 approximativement 300 colonies analysées, une s'est hybridée avec la sonde. L'analyse par restriction du plasmide isolé de ces clones a indiqué qu'il contenait un fragment *SphI* de 2,5 kb qui s'est hybridé avec la sonde en Southern-blot.

#### 10 **Analyse de la séquence du gène de BCG codant pour HBHA.**

Le gène codant pour HBHA contenu dans le fragment *SphI* de 2,5 kb a été séquencé en utilisant la méthode de terminaison d'élongation de chaîne didésoxyribonucléotidique décrite ci-dessus. Les séquences des oligonucléotides synthétiques utilisés pour le séquençage sont présentées  
 15 au tableau 1, et la stratégie de séquençage est représentée à la fig. 9. Le fragment *SphI* de 2,5 kb cloné est représenté par le trait noir. Les pointillés représentent l'ADN vecteur. Les flèches épaisses représentent le cadre ouvert de lecture d'HBHA. Les flèches fines indiquent la direction et la longueur du fragment d'ADN séquencé pour chaque oligonucléotide  
 20 indiqué au-dessus de sa flèche respective.

**TABLEAU I: Oligonucléotides utilisés pour le séquençage du gène codant pour HBHA.**

	Nom de l'oligonucléotide	séquence
5		
	HBHA Seq1	5'AGC CGG TAC AAC GAG CTG GTC 3'
	HBHA Seq1Inv	5'GAC CAG CTC GTT GTA CCG GCT 3'
	HBHA Seq2	5' CAT CCA ACA CGT CGA CTC C 3'
	HBHA Seq3	5' TTG ATG TCA TCA ATG TTC G 3'
10	HBHA Seq4	5' CGT GGA CCA GGC GGT GGA G 3'
	HBHA Seq5	5' GAC GAT CAG GAG GTT TCC CCG 3'
	Amorce inverse	5' AGC GGA TAA CAA TTT CAC ACA GGA 3'

15 L'ensemble du gène codant pour HBHA est localisé à l'intérieur du fragment *SphI* de 2,5 kb, à une extrémité du fragment, et il a été totalement séquencé à partir des deux brins.

20 La séquence nucléotidique ainsi que la séquence protéique dérivée est présentée à la fig. 10. Le cadre ouvert de lecture a été mis en évidence entre les nucléotides 331 et 927. Les 16 premiers codons après l'éventuel codon d'initiation ATG 331/333 se sont traduits en une séquence d'acides aminés identique à celle déterminée après séquençage N-terminale de la protéine HPHA purifiée. En amont de l'éventuel codon d'initiation, aux résidus 331-333, on a trouvé un codon d'arrêt TAG en phase aux positions 310-312. Ceci suggère fortement que le cadre ouvert de lecture d'HBHA ne contient pas de séquences codant pour le peptide signal classique, et 331/333 représente donc probablement le codon d'initiation. Ceci est soutenue par la présence d'un site putatif de liaison des ribosomes AGGAA que l'on trouve de 10 à 6 nucléotides en amont du codon d'initiation.

30 La séquence protéique déduite présente un poids moléculaire calculé de 21331, ce qui est inférieur au poids moléculaire apparent estimé

par SDS-PAGE. La protéine prédite est composée de 198 acides aminés et ne contient pas de cystéine, de méthionine, d'histidine ou de tryptophane. Les cinq séquences peptidiques déterminées ont été retrouvées dans la séquence protéique prédite de HBHA (souligné à la fig. 10). Des recherches d'homologie dans les bases de données de protéines ont confirmé que HBHA est une protéine mycobactérienne non identifiée jusqu'ici.

Les inventeurs ont identifié une région de la protéine impliquée dans les interactions avec les glycoconjugués sulfatés. Cette région est comprise dans la séquence suivante :

LRERAETRTDTRSRVEESRARLTKLQEDLPEQLTELRL

Des peptides impliqués au moins partiellement dans les interactions sont les suivants :

LRERAEE

TASRVEESRARL

EQLTELRL

Les répétitions à l'extrémité C-terminale de la protéine, riches en prolines, alanines et lysines, expliquent la différence entre les poids moléculaires apparents et calculés de la protéine qui subit des modifications post-traductionnelles telles que la glycosylation. Ces répétitions sont impliquées en tout ou en partie dans la définition d'une région permettant l'ancrage de la protéine dans la paroi de la cellule mycobactérienne.

L'invention concerne donc plus particulièrement la portion C-terminale de la séquence de la figure 10 et plus particulièrement la séquence comprenant approximativement les 10 à 50 derniers acides aminés entre les acides aminés 150 et 199 de la séquence de la figure 8. De façon particulièrement préférée, l'invention concerne l'extrémité C-terminale de la protéine de la figure 10, et plus particulièrement l'extrémité C-terminale comprenant les répétitions riches en proline, alanine et lysine, soit les 50 derniers acides aminés de la séquence de la figure 8.



L'invention concerne également tout variant des séquences décrites ci-dessus obtenu par addition, substitution ou délétion d'un ou plusieurs acides aminés sans modifier de manière substantielle les propriétés de la région d'intérêt. Parmi les modifications envisagées, on note tout particulièrement les mutations silencieuses au niveau des séquences nucléotidiques qui ne modifient pas la séquence peptidique de la protéine ou du fragment d'intérêt ainsi que les mutations conservatives qui consistent à substituer un ou plusieurs acides aminés présentant les mêmes caractéristiques fonctionnelles que l'acide aminé de la séquence native. Des additions ou délétions d'acides aminés sans que les propriétés des régions d'intérêt soient substantiellement modifiées font également partie de l'invention. Certains des résidus peuvent être éliminés ou modifiés en exprimant un gène modifié de cette manière chez *E. coli* comme décrit pour le gène complet. Si cette protéine fixe l'héparine avec la même affinité que la HBHA entière, cela signifie que les séquences répétées ne sont pas impliquées dans cette fixation. En revanche, si la protéine modifiée perd la capacité d'interagir avec l'héparine, la région modifiée de la protéine joue un rôle dans cette interaction.

#### 20 **Expression du gène de la HBHA de BCG chez *Escherichia coli***

L'invention concerne également un hôte cellulaire recombinant, caractérisé en ce qu'il comprend dans son génome une des séquences nucléotidiques décrites précédemment. Plus particulièrement, l'invention concerne la transformation d'hôtes cellulaires tels que *E. coli* avec une des séquences nucléotidiques de l'invention afin de produire tout ou partie de la protéine HBHA. La souche bactérienne à transformer peut comprendre la séquence complète codant pour HBHA apparaissant à la figure 10 ou encore la séquence susceptible d'être impliquée dans les interactions avec les glycoconjugués sulfatés ou la portion C-terminale de cette séquence. A titre d'exemple, le gène complet codant pour la HBHA de BCG a été introduit et exprimé dans *E. coli*.

Afin de produire la HBHA de BCG dans *Escherichia coli*, le plasmide dérivé de pUC18 qui contient le fragment *SphI* de 2.5 kb comportant le gène de la HBHA de BCG fut restreint simultanément par *Nco* I et *Kpn* I. Le fragment de 705 paires de bases issu de cette double restriction fut purifié par électroélution après migration dans un gel d'agarose de 1% selon des procédures standards (24) et finalement cloné dans le vecteur d'expression pKK388-1 (Clontech, Palo Alto, Ca., UA) préalablement restreint par *Nco* I et *Kpn* I. Le plasmide recombinant fut ensuite introduit dans *E. coli* XL1-Blue par des techniques classiques de transformation (24).

L'analyse phénotypique de la souche portant ce plasmide d'expression fut réalisée en cultivant celle-ci dans un milieu LB liquide et en stimulant la production de la HBHA recombinante par l'ajout d'isopropylthiogalactopyranoside (IPTG) selon des méthodes standards (24). Pratiquement, deux cultures en erlenmeyers de 500 ml contenant chacun 100 ml de milieu LB liquide supplémenté avec de l'ampicilline à raison de 150 µg/ml, furent respectivement inoculées avec 4 ml de préculture *E. coli* XL1-Blue contenant le plasmide d'expression de la HBHA ou le plasmide pKK388-1 représentant la culture contrôle. La croissance des deux cultures fut suivie par mesure de la densité optique à 600 nm. Quand celle-ci fut de 0,6, de l'IPTG fut ajouté aux cultures à raison de 1 mM final et les cultures furent prolongées pendant 4 heures. Des échantillons de culture furent prélevés avant l'ajout d'IPTG et au terme des 4 heures de culture en présence de l'inducteur afin d'analyser par électrophorèse en gel de polyacrylamide et par immunoblotting la production de HBHA recombinante.

Les résultats de ces différentes analyses sont repris à la figure 11.

Les pistes A et B représentent des lysats totaux avant induction de *E. coli* XL1-Blue transformée respectivement par pKK388-1 et le dérivé de pKK388-1 contenant le gène codant la HBHA. Les pistes C et

D représentent des lysats totaux après induction à l'IPTG de *E. coli* XL1-Blue transformée respectivement par pKK388-1 et le dérivé de pKK388-1 contenant le gène codant la HBHA. Les pistes E contiennent 1 µg de HBHA purifiée à partir de parois de BCG. De gauche à droite, les différents  
 5 panneaux représentent respectivement la coloration au bleu de Coomassie R-250 du gel de polyacrylamide et les immunoblots sondés par un sérum murin contrôle, un sérum murin dirigé contre la HBHA de BCG, l'anticorps monoclonal murin 3921E4 et l'anticorps monoclonal murin 4057D2. Les poids moléculaires de référence sont inscrits à la gauche du panneau  
 10 présentant la coloration au bleu de Coomassie du gel de polyacrylamide.

L'analyse en gel de polyacrylamide coloré au bleu de Coomassie montre la synthèse d'un polypeptide d'environ 25 kDa chez *E. coli* XL1-Blue portant le vecteur d'expression de la HBHA et déréprimé par l'IPTG. Ce polypeptide reconnu en immunoblotting par un antisérum  
 15 murin dirigé contre la protéine HBHA purifié d'un surnageant de culture de BCG n'est pas produit par *E. coli* XL1-Blue portant le vecteur pKK388-1 sans insert, montrant que sa synthèse dépend de la séquence d'ADN de BCG cloné dans le vecteur d'expression. Comme celle-ci est intégralement la séquence codante de la HBHA de BCG, il fut surprenant d'observer que  
 20 le polypeptide recombinant présente un poids moléculaire apparent plus faible que celui de la HBHA purifiée de BCG et qui est de 28 kDa dans le système de gel considéré.

L'invention concerne donc également une séquence peptidique recombinante caractérisée en ce qu'elle permet l'adhérence de  
 25 mycobactéries à des cellules hôtes. Plus particulièrement, l'invention concerne une séquence peptidique comprenant un polypeptide d'environ 25 kDa reconnu par l'anticorps monoclonal 3921E4 et non reconnu par l'anticorps monoclonal 4057D2. De façon préférée, la séquence peptidique recombinante de l'invention est le produit d'expression d'une souche *E. coli*  
 30 transformée avec une des séquences nucléotidiques décrites précédemment et codant pour une séquence peptidique permettant

l'adhérence de mycobactéries à des cellules hôtes, plus particulièrement une séquence nucléotidique obtenue à partir de *M. bovis* BCG ou *M. tuberculosis*. L'invention concerne également tout variant de cette séquence peptidique recombinante obtenu par addition, substitution ou  
5 déletion d'un ou plusieurs nucléotides de façon à ce que la souche transformée produise une séquence peptidique différente mais possédant la propriété d'adhérer à des cellules hôtes et plus particulièrement à des cellules épithéliales.

Comme le poids moléculaire de la HBHA déduit à partir de la  
10 séquence de son gène est significativement inférieur à son poids moléculaire apparent observé après migration électrophorétique et que cette différence est le résultat de modifications post-traductionnelles de la HBHA, ces modifications ne sont pas réalisées dans *E. coli*. Cette conclusion est étayée par le fait que nous observons une immuno-  
15 réactivité différentielle de la HBHA recombinante avec les deux anticorps monoclonaux 3921E4 et 4057D2. Si ces deux anticorps monoclonaux reconnaissent de manière équivalente en immunoblotting la HBHA purifiée de BCG, seulement 3921E4 est immunoréactif avec la HBHA recombinante produite chez *E. coli*. Cette observation montre tout d'abord que les  
20 épitopes de ces deux anticorps monoclonaux sont différents et que l'épitope reconnu par 4057D2 sur la HBHA n'est plus présent quand celle-ci est produite chez *E. coli*, confirme qu'il est localisé sur un élément moléculaire résultant d'une modification post-traductionnelle non réalisée par *E. coli*.

25 Cette modification post-traductionnelle est une glycosylation dans la mesure où il a déjà été montré que la partie saccharidique d'une glycoprotéine pouvait être immunogénique. Le motif saccharidique est très immunogénique dans la mesure où l'analyse par immunoblotting utilisant le sérum murin anti-HBHA donne lieu à un plus faible signal avec la HBHA  
30 recombinante par rapport à celui observé avec la HBHA purifié de BCG. Cette observation est d'autant plus interpellante que la quantité de HBHA

recombinante mise en jeu dans cette analyse est largement supérieure à celle de la HBHA naturelle, comme l'atteste la coloration au bleu de Coomassie du gel de polyacrylamide. Par ailleurs, comme l'immunoréactivité de 3921E4 est proche de celle observée avec le sérum murin, l'épitope reconnu par cet anticorps monoclonal est donc partiellement dépendant de la modification post-traductionnelle suspectée.

#### **Identification du site de fixation à l'héparine (« Heparin-binding site ») de la HBHA.**

Comme il a été démontré que la HBHA a un rôle direct dans l'interaction entre le BCG et les cellules épithéliales, interaction qui est inhibable par l'héparine, il est important de confirmer que cette région est impliquée dans l'interaction du BCG avec les cellules épithéliales via les polysaccharides sulfatés.

15

#### **Surexpression de la HBHA chez le BCG.**

L'invention concerne également un hôte cellulaire recombinant, caractérisé en ce qu'il comprend dans son génome une séquence nucléotidique codant pour une séquence peptidique permettant l'adhérence des mycobactéries à des cellules hôtes et en ce que cette séquence nucléotidique est surexprimée par ledit hôte. Le terme « surexprimé » utilisé dans le contexte de la présente invention signifie que l'hôte cellulaire recombinant, et particulièrement un BCG recombinant, exprime un gène et produit une protéine recombinante de manière plus importante que le microorganisme possédant naturellement ce gène.

25

Le BCG est utilisé en thérapie anticancéreuse, notamment contre les cancers superficiels de la vessie (27). Dans cette application thérapeutique, il semblerait exister une corrélation entre la faculté d'adhérence du BCG et son pouvoir antitumoral (28). Une augmentation de la capacité d'adhérence du BCG peut donc conduire à une action

30

antitumorale plus efficace. L'identification de la HBHA et le clonage de son gène rendent possible une augmentation de la capacité d'adhérence via une surexpression du gène codant la HBHA.

Des vecteurs d'expression pouvant être utilisés pour le BCG sont disponibles. Ces vecteurs d'expression confèrent notamment la résistance au mercure (31) comme seul marqueur de sélection et ne confèrent donc pas de résistance à un antibiotique, ce qui permet d'éviter que ces plasmides, dont la réplication est possible dans plusieurs espèces de mycobactéries, induisent des résistances aux antibiotiques à des pathogènes importants tels que *Mycobacterium tuberculosis* et *Mycobacterium leprae*. D'autres vecteurs d'expression peuvent également être utilisés pour le développement de BCG recombinant tels que des vecteurs comprenant des promoteurs du gène *hps60* qui ont été décrits par Stoxer et al (32). Ces vecteurs sont directement utilisables pour le développement de BCG recombinants utilisables chez l'homme ou l'animal. Par ailleurs, les promoteurs de l'antigène 85A (31) ou celui du gène *hsp60* (32) peuvent être utilisés pour l'expression de gènes recombinants chez le BCG *in vivo*.

Les signaux d'expression de l'antigène 85A ou du gène *hsp60* sont fusionnés génétiquement au gène codant la HBHA et l'ensemble est introduit dans un des vecteurs navettes décrits précédemment. Par ailleurs, le gène HBHA sous contrôle de son propre promoteur peut également être utilisé. Le BCG est transformé avec ces plasmides recombinants et analysé par immunoblotting pour la surexpression du gène de la HBHA. Des expériences d'adhérence, comme décrites plus haut, permettent d'évaluer l'adhérence de ces BCG recombinants et de le comparer aux souches non-recombinantes sur une série d'épithélia, incluant notamment l'épithélium vésical humain.

Le système d'expression chez le BCG est également utilisé pour étudier le rôle de régions d'intérêt de la HBHA chez les mycobactéries. Les gènes tronqués de la région C-terminale sont exprimés

chez le BCG afin de déterminer quelles positions de la région C-terminale sont impliquées dans la sécrétion ou dans l'encrage de la protéine au niveau de la paroi mycobactérienne. D'autres délétions ou mutations ponctuelles permettent de mieux caractériser les résidus impliqués dans la

5 modification post-traductionnelle. En effet, l'expression des gènes mutés peut être analysée par les anticorps polyclonaux anti-HBHA et la modification post-traductionnelle peut être mise en évidence à l'aide de l'anticorps monoclonal 4057D2. En effet, une réactivité avec les anticorps polyclonaux indique l'expression du gène sauvage ou muté, et l'absence

10 de réactivité avec l'anticorps monoclonal 4057D2 indique l'absence de modification post-traductionnelle de cette protéine chez le BCG exprimant un gène muté. La détermination précise de la mutation permet de confirmer de façon précise la région, et même l'acide aminé de la HBHA nécessaire à la modification post-traductionnelle.

## BIBLIOGRAPHIE

1. Smith, P.G., & Moss, A.R. (1994) in *Tuberculosis, Pathogenesis, Protection, and Control*, ed. Bloom, B.R. (ASM Press, Washington, DC), pp. 47-59.
- 5 2. Raviglione, M.C., Snider, D.E., & Kochi, A. (1995) *J. Am. Med. Assoc.* 273, 220-226.
3. Noordeen, S.K., Bravo, L.L., & Sundaresan, T.K. (1992) *Bull. WHO* 70, 7.
4. Horsburgh, C.R. (1991) *N. Engl. J. Med.* 324, 1332.
- 10 5. Barnes, P.F., Bloch, A.B., Davidson, P.T., & Snider, D.E. (1991) *N. Engl. J. Med.* 324, 1644.
6. Bloch, A.B., Cauthen, G.M., Onorato, I.M., Dansbury, K.G., Kelly, G.D., Driver, C.R., & Snider, D.E. (1994) *J. Am. Med. Assoc.* 271, 665-671.
- 15 7. Bloom, B.R., & Murray, C.L. (1992) *Science* 257, 1005-1064.
8. Riley, L.W. (1995) *Trends Microbiol.* 3, 27-31.
9. Shepard, C.C. (1957) *J. Exp. Med.* 105, 39-48.
10. Menozzi, F.D., Mutombo, R., Renauld, G., Gantiez, C., Hannah, J.H., Leininger, E., Brennan, M.J., & Locht, C. (1994) *Infect. Immun.* 62, 769-778.
- 20 11. Hannah, J.H., Menozzi, F.D., Renauld, G., Locht, C., & Brennan, M.J. (1994) *Infect. Immun.* 62, 5010-5019.
12. Isaacs, R.D. (1994) *J. Clin. Invest.* 93, 809-819.
13. Van Putten, J.P.M., & Paul, S.M. (1995) *EMBO J.* 14, 2144-2154.
- 25 14. Schlesinger, L.S., Bellinger-Kawahara, C.G., Payne, N.R., & Horwitz, M. A. (1990) *J. Immunol.* 144, 2771-2780.
15. Schlesinger, L.S., & Horwitz, M.A. (1990) *J. Clin. Invest.* 85, 1304-1314.
16. Hirsch, C.S., Ellner, J.J., Russell, D.G., & Rich, E.A. (1994) *J. Immunol.* 152, 743-753.
- 30 17. Laemmli, U.K. (1970) *Nature (London)* 227, 680-685.



18. Rouse, D.A., Morris, S.L., Karpus, A.B., Mackall, J.C., Probst, P.G., & Chaparas, S.D. (1991) *Infect. Immun.* 59, 2595-2600.
19. Menozzi, F.D., Boucher, P.E., Riveau, G., Gantiez, C., & Locht, C. (1994) *Infect. Immun.* 62, 4261-4269.
- 5 20. Balligaund, G., Laroche, Y., & Cornelis, G. (1985) *Infect. Immun.* 48, 782-786.
21. Wiker, H.G., & Harboe, M. (1992) *Microbiol. Rev.* 56, 648-661.
22. Ratliff, T.L., McCarthy, R., Telle, W.B., & Brown, E.J. (1993) *Infect. Immun.* 61, 1889-1894.
- 10 23. Kremer, L., Baulard, A., Estaquier, J., Poulain-Godefroy, O., & Locht, C. (1995) *Mol. Microbiol.* 17, 913-922.
24. Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- 15 25. Fischetti, V.A. (1989) *Clin. Microbiol. Rev.* 2, 285-314.
26. Margalit, H., Fischer, N., and Ben-Sasson, S.A. (1993) *J. Biol. Chem.* 268, 19228-19231.
27. Brosman, S.A. (1985) The use of bacillus Calmette-Guérin in the therapy of bladder carcinoma in situ. *J. Urol.* 134, 36-39
- 20 28. Hudson, M'L. A., Ritchey, J.K., Catalona, W. J., Brown, E.J., and Ratliff, T. L. (1990) Comparison of the fibronectin-binding ability and antitumor efficacy of various mycobacteria. *Cancer Res.* 50, 3843-3847.
- 25 29. Baulard, A., Kremer, L., Supply, P., Vidad, D., Bidart, J.-M., Bellet, D., and Locht, C. (1996) A new series of mycobacterial expression factors for the development of live recombinant vaccines. *Gene*, in press.
30. Kremer, L., Baulard, A., Estaquier, J., Content, J., Capron, A., & Locht, C. (1995b) *J. Bacteriol.* 177, 642-653.

31. Baulard, A., Escuyer, V., Haddad, N., Kremer, L., Locht, C., et Berche, P. 1995. « Mercury resistance as a selective marker for recombinant mycobacteria » *Microbiology* 141, 1045-1050.
32. Stoxer et al, 1991, *Nature*, Vol. 351 pp. 456-351.
- 5 33. T.P. Hopp, 1989, Use of hydrophilicity plotting procedures to identify protein antigenic segments and other interaction sites, *Methods in Enzymology*, 178, 571-585.
34. V. Krchnak, O. Mach and A. Maly, 1989, Computer prediction of B-cell determinants from protein amino acid sequences based on incidence of  $\beta$  turns, *Methods in Enzymology*, 178, 586-611.
- 10

### REVENDEICATIONS

1. Séquence peptidique permettant l'adhérence de mycobactéries à des cellules hôtes, notamment des cellules épithéliales.

5 2. Séquence peptidique selon la revendication 1, caractérisée en ce que ladite séquence comprend un antigène mycobactérien de type hémagglutinine de liaison à l'héparine (HBHA), notamment d'un antigène obtenu à partir de *M. bovis* BCG ou *M. tuberculosis*.

10 3. Séquence peptidique selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce que ladite séquence comprend la séquence peptidique de la figure 10 ou tout variant de ladite séquence permettant l'adhérence de micobactéries à des cellules hôtes et obtenu par addition, substitution ou délétion d'un ou plusieurs acides aminés de ladite séquence.

15 4. Séquence peptidique selon la revendication 3, caractérisée en ce qu'elle comprend la portion C-terminale de la séquence peptidique de la figure 10, plus particulièrement la séquence comprenant les 50 derniers acides aminés de la séquence peptidique de la figure 10 ou tout variant de cette séquence permettant l'adhérence de mycobactéries à des cellules hôtes et obtenues par addition, substitution ou délétion d'un ou plusieurs acides aminés de ladite séquence.

20 5. Séquence peptidique selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisée en ce qu'elle comprend la séquence peptidique suivante :

LRERAETRTDTRSRVEESRARLTKLQEDLPEQLTEL

25 ou toute portion ou variant de cette séquence permettant l'adhérence de mycobactéries à des cellules hôtes et obtenu par addition, substitution ou délétion d'un ou plusieurs acides aminés de ladite séquence peptidique.

30 6. Séquence peptidique selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisée en ce qu'elle est reconnue par l'anticorps monoclonal 4057D2.

7. Séquence peptidique recombinante, caractérisée en ce qu'elle permet l'adhérence de mycobactéries à des cellules hôtes, notamment des cellules épithéliales.

5 8. Séquence peptidique recombinante selon la revendication 7, caractérisée en ce que ladite séquence est le produit d'expression d'une séquence nucléotidique codant pour une séquence peptidique permettant l'adhérence de mycobactéries à des cellules hôtes, plus particulièrement à une séquence peptidique obtenue à partir de *M. bovis* BCG ou *M. tuberculosis*.

10 9. Séquence peptidique recombinante selon la revendication 8, caractérisée en ce que ladite séquence est le produit d'expression d'une souche *E. coli* transformée avec une séquence nucléotidique codant pour une séquence peptidique permettant l'adhérence de mycobactéries à des cellules hôtes, plus particulièrement une séquence nucléotidique obtenue  
15 à partir de *M. bovis* BCG ou *M. tuberculosis*.

10. Séquence peptidique recombinante selon la revendication 8, caractérisée en ce qu'elle comprend un polypeptide de recombinant d'environ 25 kDa reconnu par l'anticorps monoclonal 3921E4 et non reconnu par l'anticorps monoclonal 4057D2.

20 11. Séquence peptidique recombinante selon l'une quelconque des revendications 7 à 10, caractérisée en ce qu'elle comprend le produit d'expression d'une séquence nucléotidique codant pour la séquence peptidique de la figure 10 ou pour toute portion de ladite séquence peptidique permettant l'adhérence de mycobactéries à des  
25 cellules hôtes.

12. Séquence peptidique recombinante selon l'une quelconque des revendications 7 à 10, caractérisée en ce qu'elle est le produit d'expression de la séquence nucléotidique codant pour la portion C-terminale, plus particulièrement de la séquence comprenant les 50  
30 derniers acides aminés de la séquence peptidique de la figure 10 ou pour

toute portion de ladite séquence peptidique permettant l'adhérence de mycobactéries à des cellules hôtes.

5           **13.** Utilisation d'une séquence peptidique selon l'une quelconque des revendications 1 à 12, pour la préparation de vaccins contre les infections mycobactériennes, particulièrement les infections causées par *M. bovis* ou *M. tuberculosis*.

**14.** Utilisation d'une séquence peptidique selon l'une quelconque des revendications 1 à 12 pour le diagnostic d'infections mycobactériennes.

10           **15.** Utilisation selon la revendication 14, caractérisée en ce que ledit peptide est utilisé pour la détection d'anticorps anti-HBHA dans un fluide biologique.

**16.** Composition immunogène caractérisée en ce qu'elle comprend une séquence peptidique selon l'une quelconque des revendications 1 à 12.

15           **17.** Utilisation de glucides sulfatés ou de glycoconjugués sulfatés pour inhiber l'adhérence de mycobactéries à des cellules épithéliales.

**18.** Utilisation selon la revendication 17, caractérisée en ce que le glucide sulfaté choisi parmi le groupe comprenant notamment l'héparine, la chondroïtine sulfate et le dextran sulfate ainsi que leurs dérivés naturels ou synthétiques.

20           **19.** Séquence nucléotidique caractérisée en ce qu'elle code pour une séquence peptidique permettant l'adhérence des mycobactéries à des cellules hôtes, notamment à des cellules épithéliales.

25           **20.** Séquence nucléotidique selon la revendication 19, caractérisée en ce que ladite séquence code pour un antigène mycobactérien de type hémagglutinine de liaison à l'héparine (HBHA).

**21.** Séquence nucléotidique selon la revendication 19 ou 20, caractérisée en ce que ladite séquence code pour une séquence peptidique comprenant la séquence peptidique de la figure 10 ou toute

30

portion de ladite séquence peptidique permettant l'adhérence de mycobactéries à des cellules hôtes et obtenu par addition, substitution ou délétion d'un ou plusieurs acides aminés de ladite séquence peptidique.

5                   **22.** Séquence nucléotidique selon la revendication 21, caractérisée en ce que ladite séquence code pour une séquence peptidique correspondant à la portion C-terminale, plus particulièrement la séquence comprenant les 50 derniers acides aminés de la séquence peptidique de la figure 10 ou pour tout variant de cette séquence permettant l'adhérence de mycobactéries à des cellules hôtes et obtenu  
10 par addition, substitution ou délétion d'un ou plusieurs acides aminés de ladite séquence peptidique.

**23.** Séquence nucléotidique selon l'une quelconque des revendications 19 à 22, caractérisée en ce que ladite séquence comprend une séquence codant pour la séquence peptidique suivante :

15                   **LRERAEETRTDTRSRVEESRARLTKLQEDLPEQLTELR**

                  ou tout variant de ladite séquence peptidique permettant l'adhérence de mycobactéries à des cellules hôtes et obtenues par addition, substitution ou délétion d'un ou plusieurs acides aminés de ladite séquence peptidique.

20                   **24.** Vecteur recombinant caractérisé en ce qu'il comprend une séquence nucléotidique selon l'une quelconque des revendications 19 à 23.

**25.** Hôte cellulaire recombinant, caractérisé en ce qu'il comprend dans son génome une séquence nucléotidique selon l'une  
25 quelconque des revendications 19 à 23.

**26.** Hôte cellulaire recombinant selon la revendication 25, caractérisé en ce que ledit hôte est une mycobactérie, notamment le BCG.

**27.** Hôte selon la revendication 25 ou 26, caractérisé en ce que ladite séquence nucléotidique est surexprimée par ledit hôte.

30                   **28.** Utilisation d'un hôte cellulaire recombinant selon l'une quelconque des revendications 25 à 27, en thérapie anti-cancéreuse.

- 5      29. Nécessaire ou kit permettant de détecter la présence d'anticorps anti-HBHA dans un échantillon de fluide biologique, ledit kit comprenant une séquence peptidique selon l'une quelconque des revendications 1 à 12, ou une ou plusieurs régions immunogènes de ladite séquence adsorbée sur un support et de façon optionnelle, un anticorps marqué (et si nécessaire un anticorps non marqué) ainsi que les tampons habituels et un substrat du marqueur.

### REVENDECATIONS

1. Séquence peptidique permettant l'adhérence de mycobactéries à des cellules hôtes, notamment des cellules épithéliales.

5 2. Séquence peptidique selon la revendication 1, caractérisée en ce que ladite séquence comprend un antigène mycobactérien de type hémagglutinine de liaison à l'héparine (HBHA), notamment d'un antigène obtenu à partir de *M. bovis* BCG ou *M. tuberculosis*.

10 3. Séquence peptidique selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce que ladite séquence comprend la séquence peptidique de la figure 10 ou tout variant de ladite séquence permettant l'adhérence de micobactéries à des cellules hôtes et obtenu par addition, substitution ou délétion d'un ou plusieurs acides aminés de ladite séquence.

15 4. Séquence peptidique selon la revendication 3, caractérisée en ce qu'elle comprend la portion C-terminale de la séquence peptidique de la figure 10, plus particulièrement la séquence comprenant les 50 derniers acides aminés de la séquence peptidique de la figure 10 ou tout variant de cette séquence permettant l'adhérence de mycobactéries à des cellules hôtes et obtenues par addition, substitution ou délétion d'un ou plusieurs acides aminés de ladite séquence.

20 5. Séquence peptidique selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisée en ce qu'elle comprend la séquence peptidique suivante :

LRERAEETRTDTRSRVEESRARLTKLQEDLPEQLTEL

25 ou toute portion ou variant de cette séquence permettant l'adhérence de mycobactéries à des cellules hôtes et obtenu par addition, substitution ou délétion d'un ou plusieurs acides aminés de ladite séquence peptidique.

30 6. Séquence peptidique selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisée en ce qu'elle est reconnue par l'anticorps monoclonal 4057D2.



7. Séquence peptidique recombinante, caractérisée en ce qu'elle permet l'adhérence de mycobactéries à des cellules hôtes, notamment des cellules épithéliales.

5 8. Séquence peptidique recombinante selon la revendication 7, caractérisée en ce que ladite séquence est le produit d'expression d'une séquence nucléotidique codant pour une séquence peptidique permettant l'adhérence de mycobactéries à des cellules hôtes, plus particulièrement à une séquence peptidique obtenue à partir de *M. bovis* BCG ou *M. tuberculosis*.

10 9. Séquence peptidique recombinante selon la revendication 8, caractérisée en ce que ladite séquence est le produit d'expression d'une souche *E. coli* transformée avec une séquence nucléotidique codant pour une séquence peptidique permettant l'adhérence de mycobactéries à des cellules hôtes, plus particulièrement une séquence nucléotidique obtenue à  
15 partir de *M. bovis* BCG ou *M. tuberculosis*.

10. Séquence peptidique recombinante selon la revendication 8, caractérisée en ce qu'elle comprend un polypeptide de recombinant d'environ 25 kDa reconnu par l'anticorps monoclonal 3921E4 et non reconnu par l'anticorps monoclonal 4057D2.

20 11. Séquence peptidique recombinante selon l'une quelconque des revendications 7 à 10, caractérisée en ce qu'elle comprend le produit d'expression d'une séquence nucléotidique codant pour la séquence peptidique de la figure 10 ou pour toute portion de ladite séquence peptidique permettant l'adhérence de mycobactéries à des  
25 cellules hôtes.

12. Séquence peptidique recombinante selon l'une quelconque des revendications 7 à 10, caractérisée en ce qu'elle est le produit d'expression de la séquence nucléotidique codant pour la portion C-terminale, plus particulièrement de la séquence comprenant les 50 derniers  
30 acides aminés de la séquence peptidique de la figure 10 ou pour toute

portion de ladite séquence peptidique permettant l'adhérence de mycobactéries à des cellules hôtes.

5           13. Utilisation d'une séquence peptidique selon l'une quelconque des revendications 1 à 12, pour la préparation de vaccins contre les infections mycobactériennes, particulièrement les infections causées par *M. bovis* ou *M. tuberculosis*.

          14. Utilisation d'une séquence peptidique selon l'une quelconque des revendications 1 à 12 pour le diagnostic d'infections mycobactériennes.

10           15. Utilisation selon la revendication 14, caractérisée en ce que ledit peptide est utilisé pour la détection d'anticorps anti-HBHA dans un fluide biologique.

          16. Composition immunogène caractérisée en ce qu'elle comprend une séquence peptidique selon l'une quelconque des revendications 1 à 12.

          17. Séquence nucléotidique caractérisée en ce qu'elle code pour une séquence peptidique permettant l'adhérence des mycobactéries à des cellules hôtes, notamment à des cellules épithéliales.

20           18. Séquence nucléotidique selon la revendication 17, caractérisée en ce que ladite séquence code pour un antigène mycobactérien de type hémagglutinine de liaison à l'héparine (HBHA).

          19. Séquence nucléotidique selon la revendication 17 ou 18, caractérisée en ce que ladite séquence code pour une séquence peptidique comprenant la séquence peptidique de la figure 10 ou toute portion de ladite séquence peptidique permettant l'adhérence de mycobactéries à des cellules hôtes et obtenu par addition, substitution ou délétion d'un ou plusieurs acides aminés de ladite séquence peptidique.

25           20. Séquence nucléotidique selon la revendication 19, caractérisée en ce que ladite séquence code pour une séquence peptidique correspondant à la portion C-terminale, plus particulièrement la séquence comprenant les 50 derniers acides aminés de la séquence peptidique de la

30

figure 10 ou pour tout variant de cette séquence permettant l'adhérence de mycobactéries à des cellules hôtes et obtenu par addition, substitution ou délétion d'un ou plusieurs acides aminés de ladite séquence peptidique.

5 21. Séquence nucléotidique selon l'une quelconque des revendications 17 à 20, caractérisée en ce que ladite séquence comprend une séquence codant pour la séquence peptidique suivante :

LRERAEETRTDTRSRVEESRARLTKLQEDLPEQLTELK

10 ou tout variant de ladite séquence peptidique permettant l'adhérence de mycobactéries à des cellules hôtes et obtenues par addition, substitution ou délétion d'un ou plusieurs acides aminés de ladite séquence peptidique.

22. Vecteur recombinant caractérisé en ce qu'il comprend une séquence nucléotidique selon l'une quelconque des revendications 17 à 21.

15 23. Hôte cellulaire recombinant, caractérisé en ce qu'il comprend dans son génome une séquence nucléotidique selon l'une quelconque des revendications 17 à 21.

24. Hôte cellulaire recombinant selon la revendication 23, caractérisé en ce que ledit hôte est une mycobactérie, notamment le BCG.

20 25. Hôte selon la revendication 23 ou 24, caractérisé en ce que ladite séquence nucléotidique est surexprimée par ledit hôte.

26. Utilisation d'un hôte cellulaire recombinant selon l'une quelconque des revendications 23 à 25, en thérapie anti-cancéreuse.

25 27. Nécessaire ou kit permettant de détecter la présence d'anticorps anti-HBHA dans un échantillon de fluide biologique, ledit kit comprenant une séquence peptidique selon l'une quelconque des revendications 1 à 12, ou une ou plusieurs régions immunogènes de ladite séquence adsorbée sur un support et de façon optionnelle, un anticorps marqué (et si nécessaire un anticorps non marqué) ainsi que les tampons habituels et un substrat du marqueur.

## REVENDECATIONS

1. Séquence peptidique permettant l'adhérence de mycobactéries à des cellules hôtes, notamment des cellules épithéliales.

2. Séquence peptidique selon la revendication 1, caractérisée en ce que ladite séquence comprend un antigène mycobactérien de type hémagglutinine de liaison à l'héparine (HBHA), notamment d'un antigène obtenu à partir de *M. bovis* BCG ou *M. tuberculosis*.

3. Séquence peptidique selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce que ladite séquence comprend la séquence peptidique de la figure 10 ou tout variant de ladite séquence permettant l'adhérence de micobactéries à des cellules hôtes et obtenu par addition, substitution ou délétion d'un ou plusieurs acides aminés de ladite séquence.

4. Séquence peptidique selon la revendication 3, caractérisée en ce qu'elle comprend la portion C-terminale de la séquence peptidique de la figure 10, plus particulièrement la séquence comprenant les 50 derniers acides aminés de la séquence peptidique de la figure 10 ou tout variant de cette séquence permettant l'adhérence de mycobactéries à des cellules hôtes et obtenues par addition, substitution ou délétion d'un ou plusieurs acides aminés de ladite séquence.

5. Séquence peptidique selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisée en ce qu'elle comprend la séquence peptidique suivante :

LRERAEETRTDTRSRVEESRARLTKLQEDLPEQLTELR

ou toute portion ou variant de cette séquence permettant l'adhérence de mycobactéries à des cellules hôtes et obtenu par addition, substitution ou délétion d'un ou plusieurs acides aminés de ladite séquence peptidique.

6. Séquence peptidique selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisée en ce qu'elle est reconnue par l'anticorps monoclonal 4057D2.

7. Séquence peptidique recombinante, caractérisée en ce qu'elle permet l'adhérence de mycobactéries à des cellules hôtes, notamment des cellules épithéliales.

5 8. Séquence peptidique recombinante selon la revendication 7, caractérisée en ce que ladite séquence est le produit d'expression d'une séquence nucléotidique codant pour une séquence peptidique permettant l'adhérence de mycobactéries à des cellules hôtes, plus particulièrement à une séquence peptidique obtenue à partir de *M. bovis* BCG ou *M. tuberculosis*.

10 9. Séquence peptidique recombinante selon la revendication 8, caractérisée en ce que ladite séquence est le produit d'expression d'une souche *E. coli* transformée avec une séquence nucléotidique codant pour une séquence peptidique permettant l'adhérence de mycobactéries à des cellules hôtes, plus particulièrement une séquence nucléotidique obtenue à  
15 partir de *M. bovis* BCG ou *M. tuberculosis*.

10. Séquence peptidique recombinante selon la revendication 8, caractérisée en ce qu'elle comprend un polypeptide de recombinant d'environ 25 kDa reconnu par l'anticorps monoclonal 3921E4 et non reconnu par l'anticorps monoclonal 4057D2.

20 11. Séquence peptidique recombinante selon l'une quelconque des revendications 7 à 10, caractérisée en ce qu'elle comprend le produit d'expression d'une séquence nucléotidique codant pour la séquence peptidique de la figure 10 ou pour toute portion de ladite séquence peptidique permettant l'adhérence de mycobactéries à des  
25 cellules hôtes.

12. Séquence peptidique recombinante selon l'une quelconque des revendications 7 à 10, caractérisée en ce qu'elle est le produit d'expression de la séquence nucléotidique codant pour la portion C-terminale, plus particulièrement de la séquence comprenant les 50  
30 derniers acides aminés de la séquence peptidique de la figure 10 ou pour

toute portion de ladite séquence peptidique permettant l'adhérence de mycobactéries à des cellules hôtes.

5           **13.** Utilisation d'une séquence peptidique selon l'une quelconque des revendications 1 à 12, pour la préparation de vaccins contre les infections mycobactériennes, particulièrement les infections causées par *M. bovis* ou *M. tuberculosis*.

**14.** Utilisation d'une séquence peptidique selon l'une quelconque des revendications 1 à 12 dans la préparation d'une trousse de diagnostic d'infection mycobactérienne.

10           **15.** Utilisation selon la revendication 14, caractérisée en ce que ledit peptide est utilisé pour la détection d'anticorps anti-HBHA dans un fluide biologique.

**16.** Composition immunogène caractérisée en ce qu'elle comprend une séquence peptidique selon l'une quelconque des revendications 1 à 12.

15           **17.** Séquence nucléotidique caractérisée en ce qu'elle code pour une séquence peptidique permettant l'adhérence des mycobactéries à des cellules hôtes, notamment à des cellules épithéliales.

**18.** Séquence nucléotidique selon la revendication 17, caractérisée en ce que ladite séquence code pour un antigène mycobactérien de type hémagglutinine de liaison à l'héparine (HBHA).

20           **19.** Séquence nucléotidique selon la revendication 17 ou 18, caractérisée en ce que ladite séquence code pour une séquence peptidique comprenant la séquence peptidique de la figure 10 ou toute  
25           portion de ladite séquence peptidique permettant l'adhérence de mycobactéries à des cellules hôtes et obtenu par addition, substitution ou délétion d'un ou plusieurs acides aminés de ladite séquence peptidique.

**20.** Séquence nucléotidique selon la revendication 19, caractérisée en ce que ladite séquence code pour une séquence  
30           peptidique correspondant à la portion C-terminale, plus particulièrement la

5 séquence comprenant les 50 derniers acides aminés de la séquence peptidique de la figure 10 ou pour tout variant de cette séquence permettant l'adhérence de mycobactéries à des cellules hôtes et obtenu par addition, substitution ou délétion d'un ou plusieurs acides aminés de ladite séquence peptidique.

21. Séquence nucléotidique selon l'une quelconque des revendications 17 à 20, caractérisée en ce que ladite séquence comprend une séquence codant pour la séquence peptidique suivante :

LRERAEETRTDTRSRVEESRARLTKLQEDLPEQLTELR

10 ou tout variant de ladite séquence peptidique permettant l'adhérence de mycobactéries à des cellules hôtes et obtenues par addition, substitution ou délétion d'un ou plusieurs acides aminés de ladite séquence peptidique.

15 22. Vecteur recombinant caractérisé en ce qu'il comprend une séquence nucléotidique selon l'une quelconque des revendications 17 à 21.

23. Hôte cellulaire recombinant, caractérisé en ce qu'il comprend dans son génome une séquence nucléotidique selon l'une quelconque des revendications 17 à 21.

20 24. Hôte cellulaire recombinant selon la revendication 23, caractérisé en ce que ledit hôte est une mycobactérie, notamment le BCG.

25 25. Hôte selon la revendication 23 ou 24, caractérisé en ce que ladite séquence nucléotidique est surexprimée par ledit hôte.

26. Utilisation d'un hôte cellulaire recombinant selon l'une quelconque des revendications 23 à 25, en thérapie anti-cancéreuse.

30 27. Nécessaire ou kit permettant de détecter la présence d'anticorps anti-HBHA dans un échantillon de fluide biologique, ledit kit comprenant une séquence peptidique selon l'une quelconque des revendications 1 à 12, ou une ou plusieurs régions immunogènes de ladite séquence adsorbée sur un support et de façon optionnelle, un anticorps

marqué (et si nécessaire un anticorps non marqué) ainsi que les tampons habituels et un substrat du marqueur.



### **REVENDEICATIONS**

1. Séquence peptidique permettant l'adhérence de mycobactéries à des cellules hôtes, notamment des cellules épithéliales, caractérisée en ce que ladite séquence comprend un antigène mycobactérien de type hémagglutinine de liaison à l'héparine (HBHA),  
5 notamment d'un antigène obtenu à partir de *M. bovis* BCG ou *M. tuberculosis*, et comprenant la séquence peptidique de la figure 10 ou tout variant de ladite séquence permettant l'adhérence de mycobactéries à des cellules hôtes et obtenu par addition, substitution ou délétion d'un ou  
10 plusieurs acides aminés de ladite séquence.

2. Séquence peptidique selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle comprend la portion C-terminale de la séquence peptidique de la figure 10, plus particulièrement la séquence comprenant les 50 derniers acides aminés de la séquence peptidique de la figure 10 ou tout variant de  
15 cette séquence permettant l'adhérence de mycobactéries à des cellules hôtes et obtenues par addition, substitution ou délétion d'un ou plusieurs acides aminés de ladite séquence.

3. Séquence peptidique selon l'une quelconque des revendications 1 à 2, caractérisée en ce qu'elle comprend la séquence peptidique suivante :  
20

LRERAEETRTDTRSRVEESRARLTKLQEDLPEQLTEL

ou toute portion ou variant de cette séquence permettant l'adhérence de mycobactéries à des cellules hôtes et obtenu par addition, substitution ou délétion d'un ou plusieurs acides aminés de ladite séquence  
25 peptidique.

4. Séquence peptidique selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce qu'elle est reconnue par l'anticorps monoclonal 4057D2.

5. Séquence peptidique recombinante, caractérisée en ce qu'elle permet l'adhérence de mycobactéries à des cellules hôtes, notamment des cellules épithéliales.

5 6. Séquence peptidique recombinante selon la revendication 5, caractérisée en ce que ladite séquence est le produit d'expression d'une séquence nucléotidique codant pour une séquence peptidique permettant l'adhérence de mycobactéries à des cellules hôtes, plus particulièrement à une séquence peptidique obtenue à partir de *M. bovis* BCG ou *M. tuberculosis*.

10 7. Séquence peptidique recombinante selon la revendication 6, caractérisée en ce que ladite séquence est le produit d'expression d'une souche *E. coli* transformée avec une séquence nucléotidique codant pour une séquence peptidique permettant l'adhérence de mycobactéries à des cellules hôtes, plus particulièrement une séquence nucléotidique obtenue à partir de *M. bovis* BCG ou *M. tuberculosis*.

15 8. Séquence peptidique recombinante selon la revendication 6, caractérisée en ce qu'elle comprend un polypeptide de recombinant d'environ 25 kDa reconnu par l'anticorps monoclonal 3921E4 et non reconnu par l'anticorps monoclonal 4057D2.

20 9. Séquence peptidique recombinante selon l'une quelconque des revendications 5 à 8, caractérisée en ce qu'elle comprend le produit d'expression d'une séquence nucléotidique codant pour la séquence peptidique de la figure 10 ou pour toute portion de ladite séquence peptidique permettant l'adhérence de mycobactéries à des cellules hôtes.

25 10. Séquence peptidique recombinante selon l'une quelconque des revendications 5 à 8, caractérisée en ce qu'elle est le produit d'expression de la séquence nucléotidique codant pour la portion C-terminale, plus particulièrement de la séquence comprenant les 50 derniers acides aminés de la séquence peptidique de la figure 10 ou pour toute

portion de ladite séquence peptidique permettant l'adhérence de mycobactéries à des cellules hôtes.

5 11. Utilisation d'une séquence peptidique selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, pour la préparation de vaccins contre les infections mycobactériennes, particulièrement les infections causées par *M. bovis* ou *M. tuberculosis*.

12. Utilisation d'une séquence peptidique selon l'une quelconque des revendications 1 à 10 dans la préparation d'une trousse de diagnostic d'infection mycobactérienne.

10 13. Utilisation selon la revendication 12, caractérisée en ce que ledit peptide est utilisé pour la détection d'anticorps anti-HBHA dans un fluide biologique.

14. Composition immunogène caractérisée en ce qu'elle comprend une séquence peptidique selon l'une quelconque des revendications 1 à 10.

15 15. Séquence nucléotidique caractérisée en ce qu'elle code pour une séquence peptidique permettant l'adhérence des mycobactéries à des cellules hôtes, notamment à des cellules épithéliales.

20 16. Séquence nucléotidique selon la revendication 15, caractérisée en ce que ladite séquence code pour un antigène mycobactérien de type hémagglutinine de liaison à l'héparine (HBHA).

25 17. Séquence nucléotidique selon la revendication 15 ou 16, caractérisée en ce que ladite séquence code pour une séquence peptidique comprenant la séquence peptidique de la figure 10 ou toute portion de ladite séquence peptidique permettant l'adhérence de mycobactéries à des cellules hôtes et obtenu par addition, substitution ou délétion d'un ou plusieurs acides aminés de ladite séquence peptidique.

18. Séquence nucléotidique selon la revendication 17, caractérisée en ce que ladite séquence code pour une séquence peptidique

correspondant à la portion C-terminale, plus particulièrement la séquence comprenant les 50 derniers acides aminés de la séquence peptidique de la figure 10 ou pour tout variant de cette séquence permettant l'adhérence de mycobactéries à des cellules hôtes et obtenu par addition, substitution ou  
5 déletion d'un ou plusieurs acides aminés de ladite séquence peptidique.

**19.** Séquence nucléotidique selon l'une quelconque des revendications 15 à 18, caractérisée en ce que ladite séquence comprend une séquence codant pour la séquence peptidique suivante :

LRERAEETRTDTRSRVEESRARLTKLQEDLPEQLTEL

10 ou tout variant de ladite séquence peptidique permettant l'adhérence de mycobactéries à des cellules hôtes et obtenues par addition, substitution ou déletion d'un ou plusieurs acides aminés de ladite séquence peptidique.

**20.** Vecteur recombinant caractérisé en ce qu'il comprend une  
15 séquence nucléotidique selon l'une quelconque des revendications 15 à 19.

**21.** Hôte cellulaire recombinant, caractérisé en ce qu'il comprend dans son génome une séquence nucléotidique selon l'une quelconque des revendications 15 à 19.

**22.** Hôte cellulaire recombinant selon la revendication 21,  
20 caractérisé en ce que ledit hôte est une mycobactérie, notamment le BCG.

**23.** Hôte selon la revendication 21 ou 22, caractérisé en ce que ladite séquence nucléotidique est surexprimée par ledit hôte.

**24.** Utilisation d'un hôte cellulaire recombinant selon l'une  
25 quelconque des revendications 21 à 23, dans la fabrication d'un médicament pour la thérapie anti-cancéreuse.

**25.** Nécessaire ou kit permettant de détecter la présence d'anticorps anti-HBHA dans un échantillon de fluide biologique, ledit kit comprenant une séquence peptidique selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, ou une ou plusieurs régions immunogènes de ladite

séquence adsorbée sur un support et de façon optionnelle, un anticorps marqué (et si nécessaire un anticorps non marqué) ainsi que les tampons habituels et un substrat du marqueur.

1/11

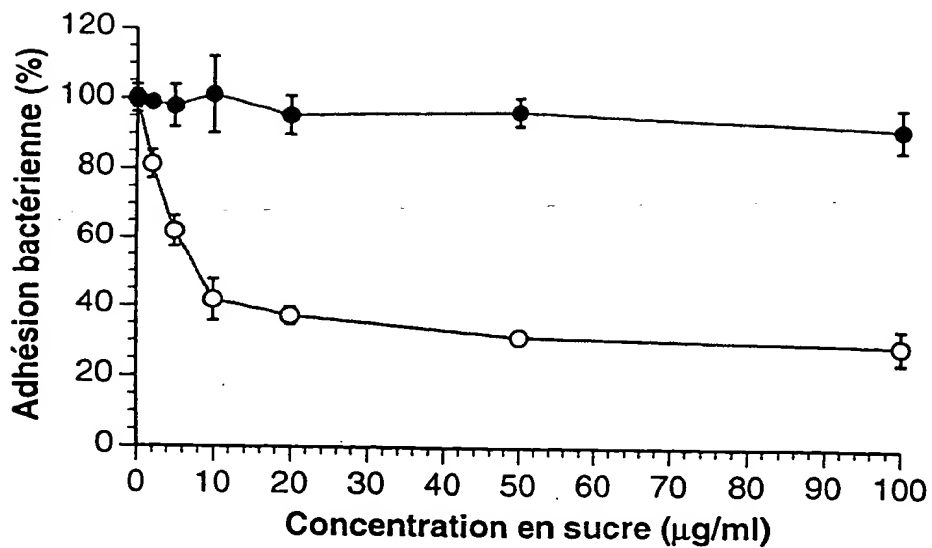


Fig. 1A

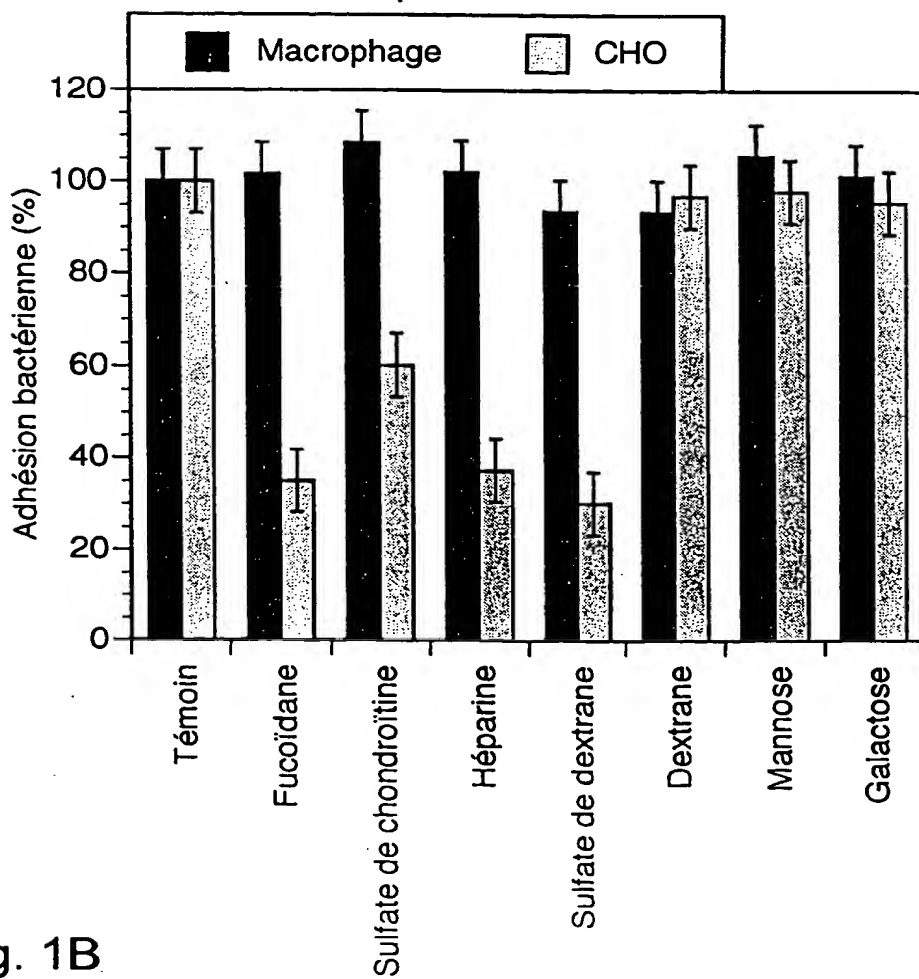


Fig. 1B

2/11

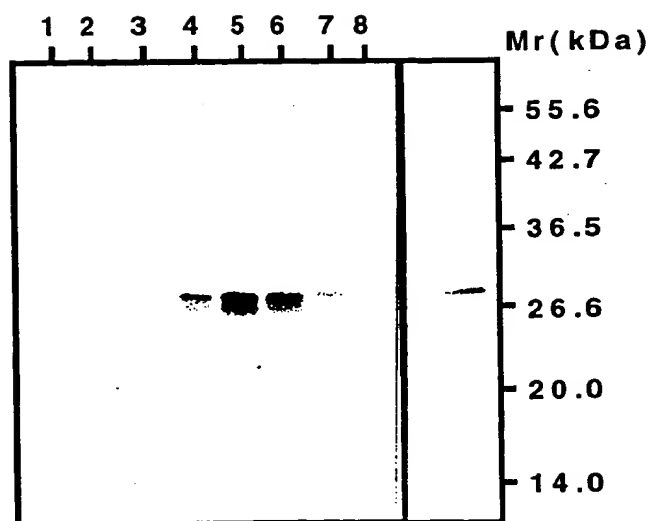


Fig. 2

3/11

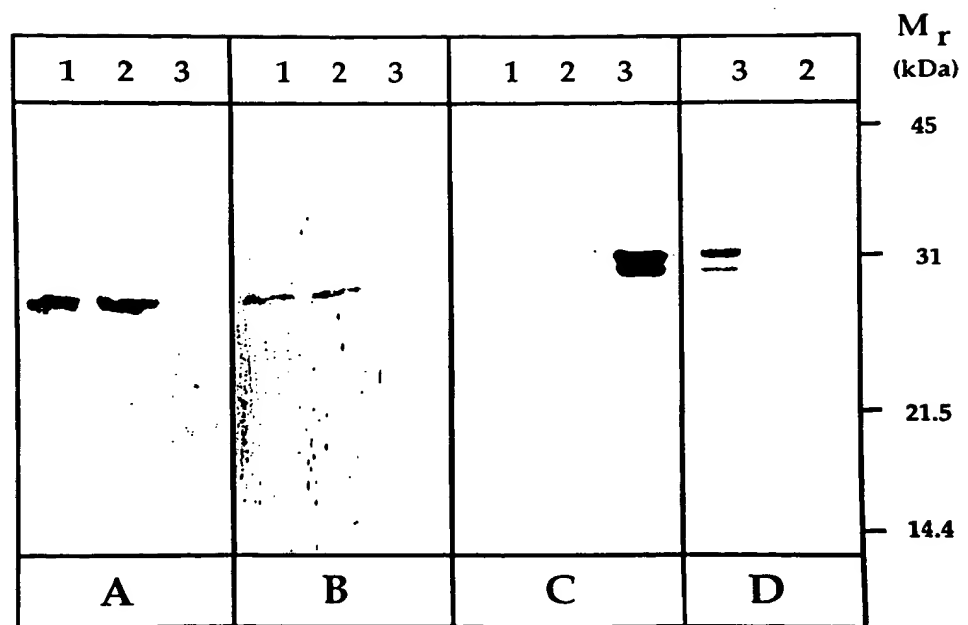


Fig. 3



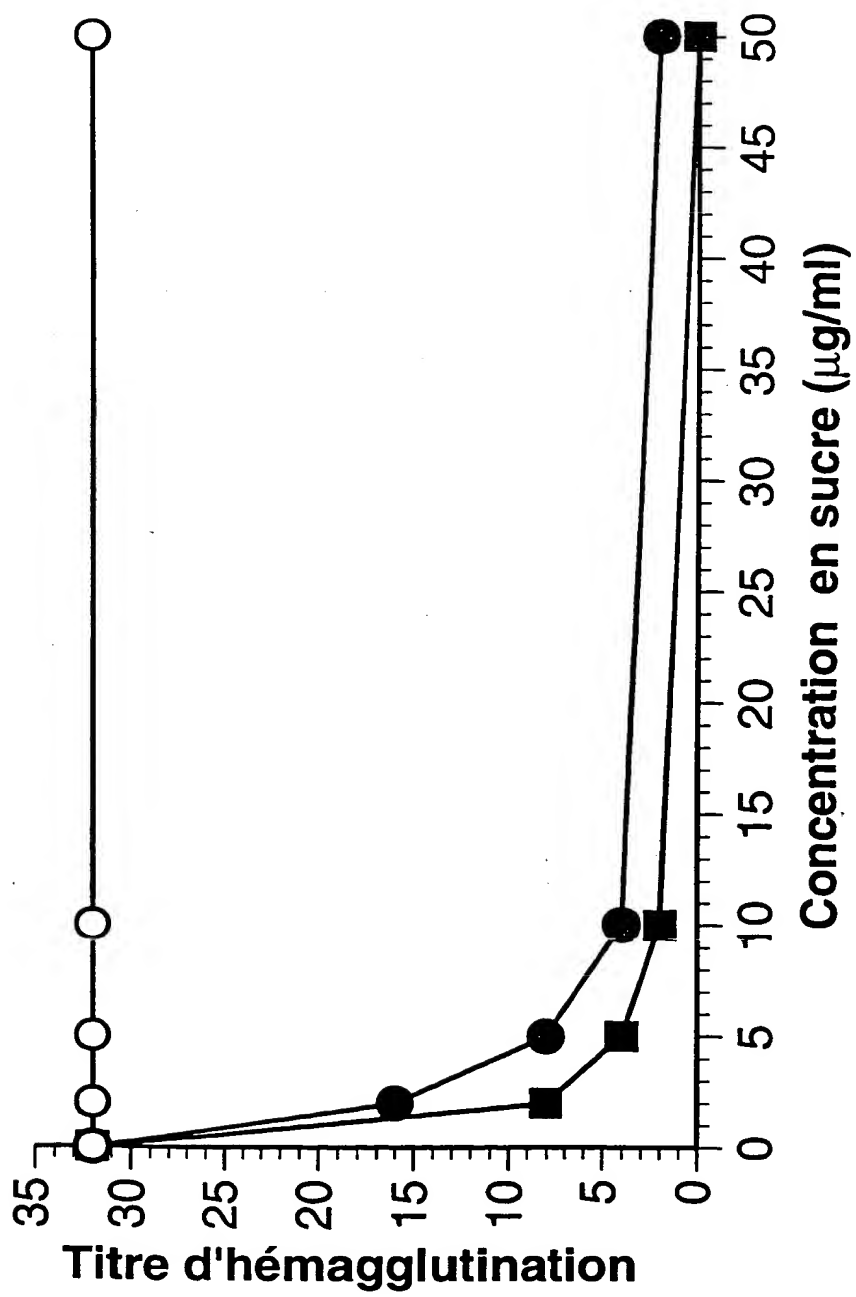
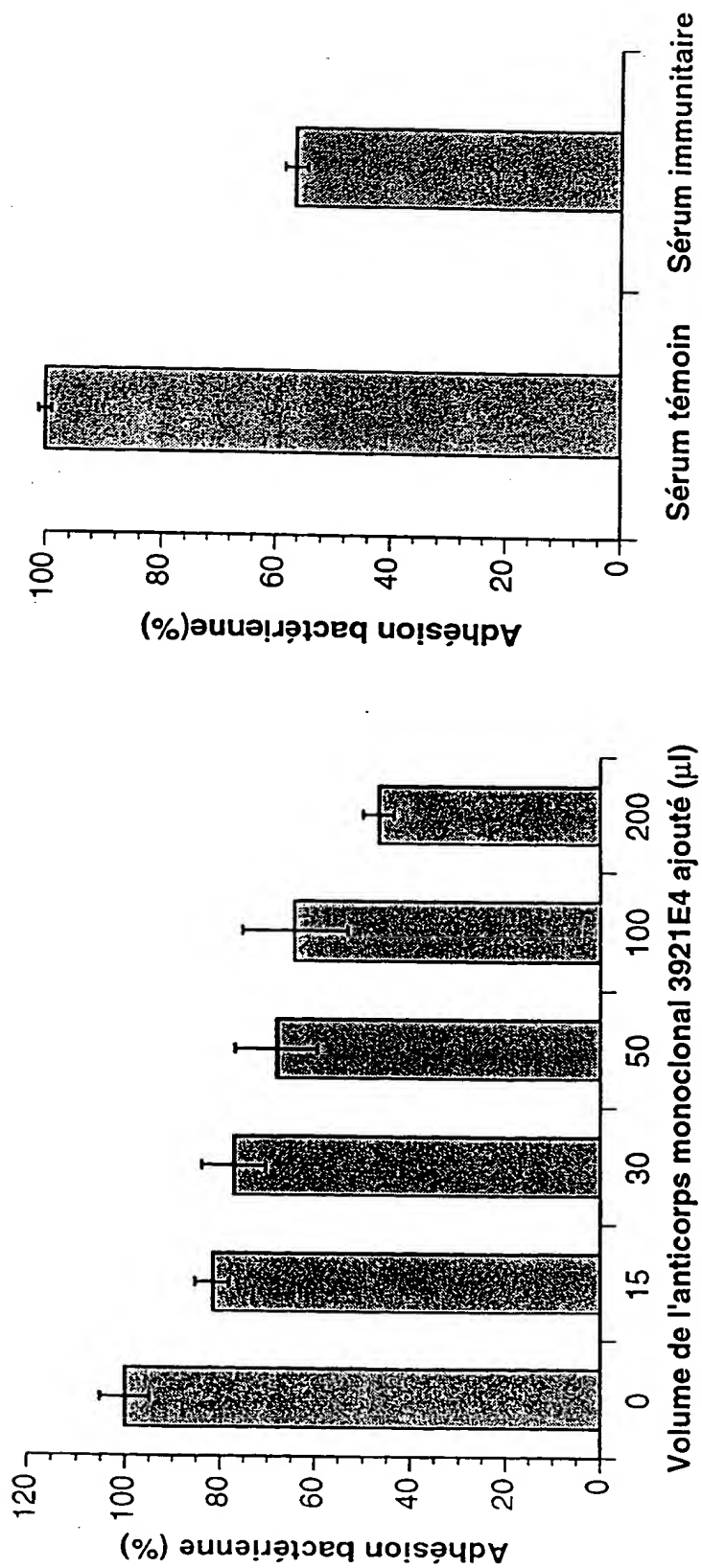


Fig. 4



6/11

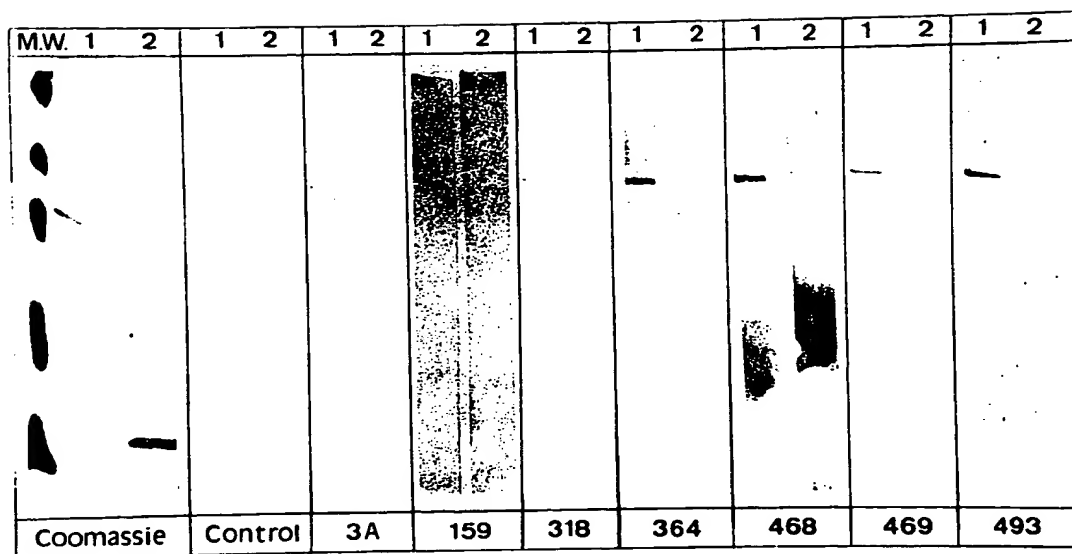


Fig. 6

**K A E G Y L E A A T S R Y N E L V**  
aag gcc gag ggc tac ctc gag gcc ggc act agc cgg tac aac gag ctg gtc  
 ttc cgg ctc ccg atg gag ctc cgg cgc tga tgc gcc atg ttg ctc gac cag  
 oligo 1441

**E R G E A A L E R L R S Q Q S F E**  
 gag cgc ggt gag gcc gct cta gag cgg ctg cgc agc cag cag agc ttc gag  
 ctc ggc cca ctc cgg cga gat ctc gcc gag gac gcg tgc gtc gtc tgc aag ctc

**E V S A P A E G Y V D Q A V E L**  
 gaa gtg tgc gcg gcc gcc gaa gcc tac gtg gac cag gcg gtc gag ct  
 ctt cac agc cgc cgg cgg cgt ctt ccg atg cac ctc ctc cgc ctc ga  
 oligo 1443 rev.

Fig. 7

8/11

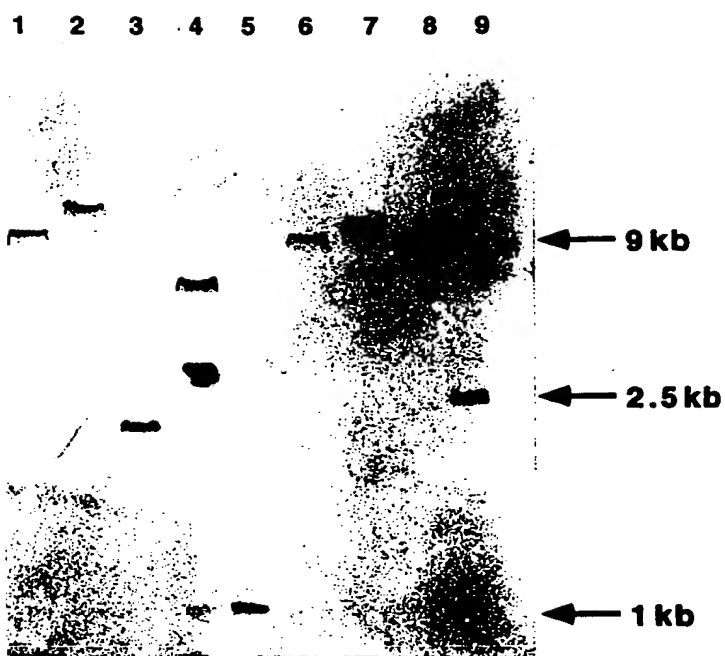


Fig. 8

9/11

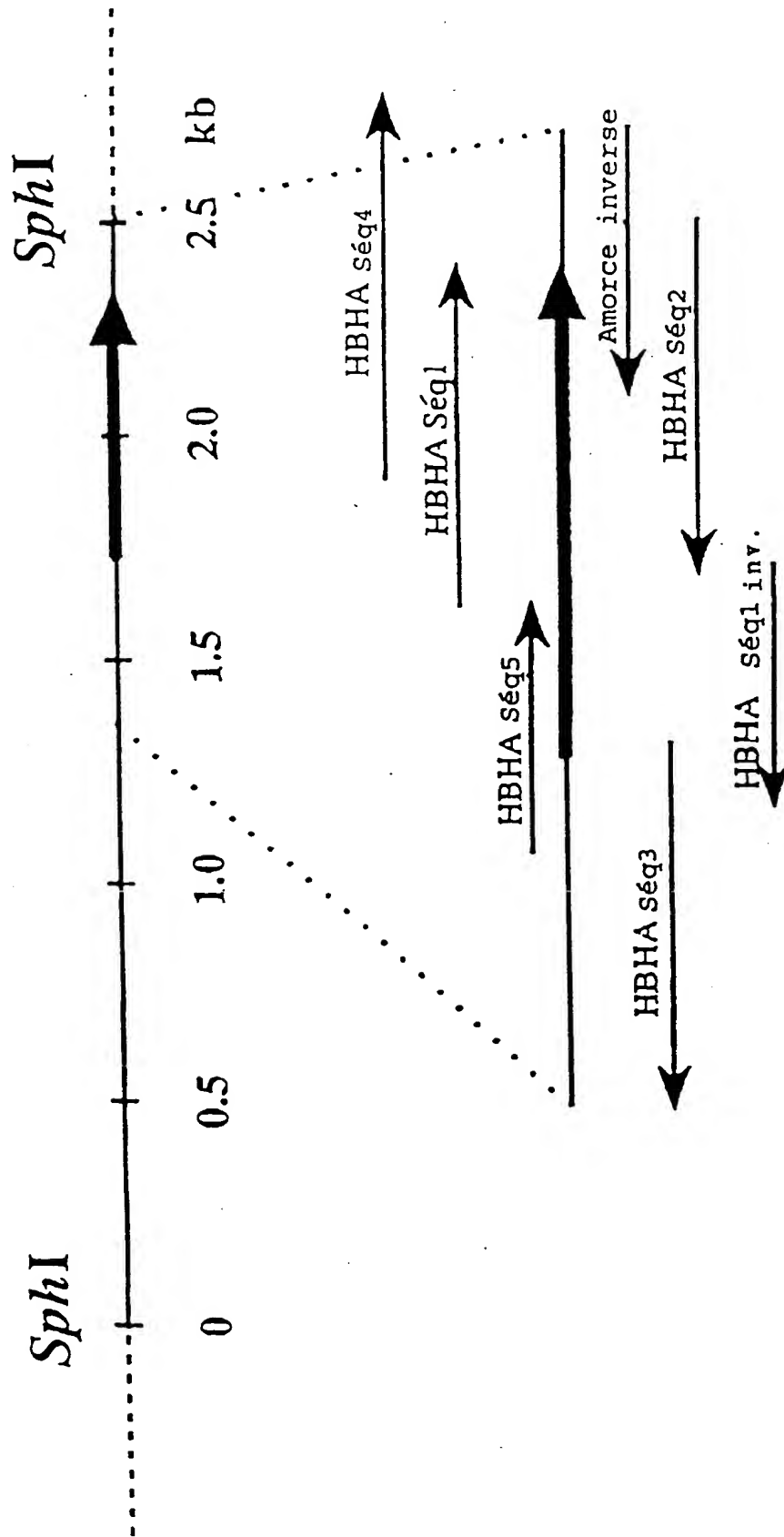


Fig. 9

10/11

1

cgg ctg gcg ggt aat caa acc tga agg aca gtc atc tgg gtg agg tcg acc gca ggc tga

61

tcc agc cga tcg gcc ggc gct ggc caa cag cga ctc cgt cga tga cgt gca gca aag gag

121

aca tgt agt gac cgg atc agc tgg gcc tga cat cta cga act cga ccg aca acc gac ccg

181

acg atc agg agg ttt ccc cgg caa gtc gcg tgc cat gtc aat ccg cgg gtc ttg act agt

241

cct ccc tgg agg agc cga cgc ttg ccc caa cgt cca gac caa aga tgt aag aac gcc gat

301

atc aga aaa tag tta atg aaa gga ata ccc atg gct gaa aac tcg aac att gat gac atc  
M A E N S N I D D I

361

aag gct ccg ttg ctt gcc gcg ctt gga gcg gcc gac ctg gcc ttg gcc act gtc aac gag  
K A P L L A A L G A A D L A L A T V N E

421

ttg atc acg aac ctg cgt gag cgt gcg gag gag act cgt acg gac acc cgc agc cgg gtc  
L I T N L R E R A E E T R T D T R S R V

481

gag gag agc cgt gct cgc ctg acc aag ctg cag gaa gat ctg ccc gag cag ctc acc gag  
E E S R A R L T K L O E D L P E O L T E

541

ctg cgt gag aag ttc acc gcc gag gag ctg cgt aag gcc gcc gag ggc tac ctc gag gcc  
L R E K F T A E E L R K A A E G Y L E A

601

gcg act agc cgg tac aac gag ctg gtc gag cgc ggt gag gcc gct cta gag cgg ctg cgc  
A T S R Y N E L V E R G E A A L E R L R

661

agc cag cag agc ttc gag gaa gtg tcg gcg ccc gcc gaa ggc tac gtg gac cag gcg gtg  
S Q Q S F E E V S A P A E G Y V D O A V

721

gag ttg acc cag gag gcg ttg ggt acg gtc gca tcg cag acc cgc gcg gtc ggt gag cgt  
E L T O E A L G T V A S Q T R A V G E R

781

gcc gcc aag ctg gtc ggc atc gag ctg cct aag aag gct gct ccg gcc aag aag gcc gct  
A A K L V G I E L P K K A A P A K K A A

841

ccg gcc aag aag gcc gct ccg gcc aag aag gcg gcg gcc aag aag gcg ccc gcg aag aag  
P A K K A A P A K K A A A K K A P A K K

901

gcg gcg gcc aag aag gtc acc cag aag tag tcg ggc tcc gaa tca cca tcg act ccg agt  
A A A K K V T Q K \*

961

cgc cca cgg ggc gac tcg gag tcg acg tgt tgg atg caa acc gca tag tct gaa tgc gtg

1021

agc cac ctc gtg ggt acc gtc atg ctg gta ttg ctg gtc gcc gtc ttg gtg aca gcg gtg

1081

tac gcg ttt gtg cat gc  
SphI

Fig. 10

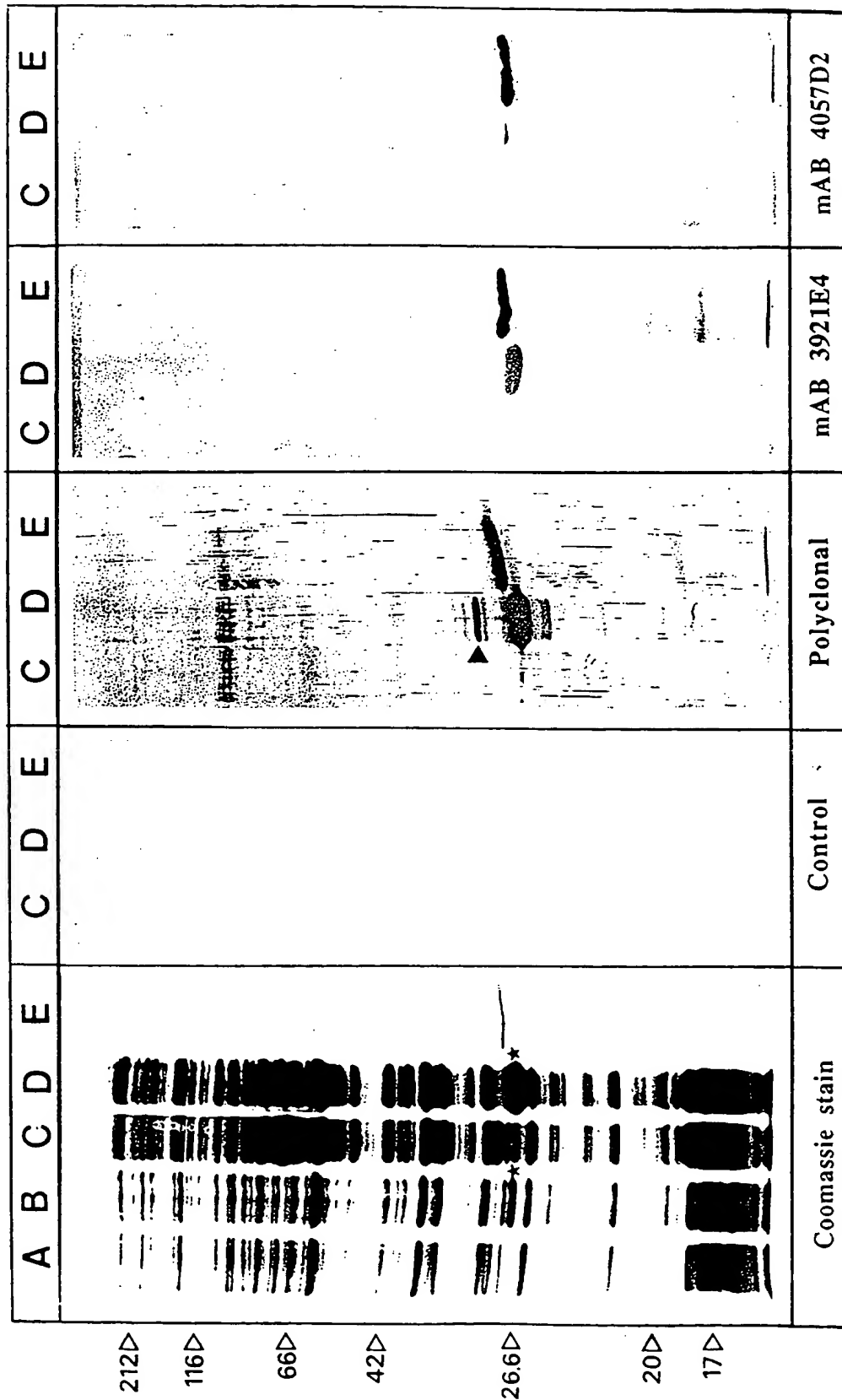


Fig. 11